

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RÔMULO JOÃO DEBARBA

BIOMASSA E GLICOSÍDEOS DITERPÊNICOS EM GENÓTIPOS DE ESTÊVIA (*Stevia rebaudiana* Bert.) COM ADUBAÇÃO NITROGENADA NAS CONDIÇÕES DO ALTO VALE DO ITAJAÍ – SC- BRASIL



CURITIBA

2017

RÔMULO JOÃO DEBARBA

BIOMASSA E GLICOSÍDEOS DITERPÊNICOS EM GENÓTIPOS DE ESTÉVIA (*Stevia rebaudiana* Bert.) COM ADUBAÇÃO NITROGENADA NAS CONDIÇÕES DO ALTO VALE DO ITAJAÍ – SC- BRASIL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Agronomia.

Orientador: Prof.º Dr. Cícero Deschamps

Coorientador: Prof.º Dr. Henrique Soares Koehler

CURITIBA

2017

D286 Debarba, Rômulo João
Biomassa e glicosídeos diterpênicos em genótipos de Estévia
(*Stevia rebaudiana* Bert.) com adubação nitrogenada nas condições
do Alto Vale do Itajaí – SC-Brasil. / Rômulo João Debarba.
Curitiba: 2017.
x, 70 f.; il.

Orientador: Cícero Deschamps
Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná.
Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em
Agronomia – Produção Vegetal.

1. Stevia rebaudiana – Cultivo – Santa Catarina. 2. Stevia
rebaudiana – Fertilizantes nitrogenados. I. Deschamps, Cícero.
II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias.
Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal.
III. Título.

CDU 582.998.1(816.4)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor CIÊNCIAS AGRÁRIAS
Programa de Pós-Graduação AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL)

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **ROMULO JOAO DEBARBA** intitulada: **BIOMASSA E GLICOSÍDEOS DITERPÊNICOS EM GENÓTIPOS DE ESTÉVIA (*Stevia rebaudiana* Bert.) COM ADUBAÇÃO NITROGENADA NAS CONDIÇÕES DO ALTO VALE DO ITAJAÍ/SC-BRASIL.**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

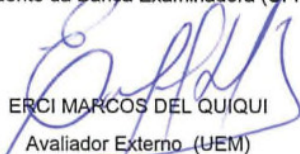
A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 01 de Junho de 2017.



CICERO DESCHAMPS

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)



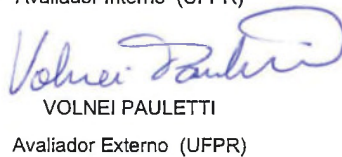
ERICI MARCOS DEL QUIQUI
Avaliador Externo (UEM)



HENRIQUE SOARES KOEHLER
Avaliador Interno (UFPR)



ÁTILA FRANCISCO MÓGOR
Avaliador Interno (UFPR)



VOLNEI PAULETTI
Avaliador Externo (UFPR)

Dedico.

A Deus

A minha esposa Solange.

Aos meus pais, João e Marly

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Ao Sr. Willamarin João Seeman pelo carinho e por estar sempre presente nos momentos de dificuldades.

Ao Instituto Federal Catarinense por me oportunizar a possibilidade de crescimento pessoal.

A Universidade Federal do Paraná e todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal pelo apoio e conhecimentos repassados.

Ao meu orientador e coorientador pela paciência e confiança.

Aos meus colegas Alexandra, Renata, Alceu, Sidinei, Isabel, pela ajuda prestada.

A técnica em laboratório do IFC – Campus Rio do Sul, Fátima, por me auxiliar nas pesquisas e experimentos.

Ao técnico de campo do IFC – Campus Rio do Sul, pelos auxílios na implantação e avaliação de meus experimentos.

A minha esposa Solange pela paciência e pela privação de minha presença em alguns momentos importantes de sua vida.

Ao professor Luiz Alberto Kanis pelos ensinamentos e auxílio nos meus experimentos.

Ao colega Diego Moterle pelos auxílios com aparelho de cromatografia.

BIOGRAFIA DO AUTOR

Rômulo João Debarba, filho de João Favorito Debarba e Marly Sandra Debarba, Nascido em Ituporanga, Estado de Santa Catarina, em 27 de junho de 1980, hoje casado com Solange Machado Debarba.

Cursou o 1º grau nos colégios Ruy Barbosa e Henrique Fontes em Rio do Sul – SC e o 2º grau no colégio Uninvest também na cidade de Rio do Sul – SC. Em 2003 recebeu o grau de Engenheiro Agrônomo pela Universidade Federal de Santa Catarina, em Florianópolis – SC.

Em 2004 ingressou no curso de Mestrado em Agroecossistemas – UFSC – Centro de ciências Agrárias. Recebeu o Título de Mestre em Agroecossistemas em 2006.

Atualmente é professor efetivo do Instituto Federal Catarinense campus Rio do Sul onde leciona para o curso técnico de nível médio em Agroecologia as disciplinas de Manejo Ecológico do Solo e Agroecossistemas de Cultivos Perenes. Leciona também para o curso superior em Agronomia as disciplinas de Agricultura e Ciência do Ambiente, Viticultura e Enologia, Manejo e Utilização de Pastagens e Plantas Bioativas.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE ANEXOS.....	vii
RESUMO	ix
ABSTRACT.....	x
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 HISTÓRICO.....	3
2.2 DESCRIÇÃO BOTÂNICA	4
2.3 GLICOSÍDEOS DITERPÊNICOS	5
2.4 USOS E PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS	7
REFERÊNCIAS	8
3 CAPÍTULO II – DESEMPENHO FENOTÍPICO DE QUATRO GENÓTIPOS DE ESTÉVIA (<i>Stevia rebaudiana</i> Bert.) NA REGIÃO DO ALTO VALE DO ITAJAÍ, SANTA CATARINA, BRASIL.....	12
3.1 INTRODUÇÃO.....	13
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	14
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
Desenvolvimento de Plantas	20
Produção de esteviosídeo e rebaudiosídeo A	27
3.4 CONCLUSÕES.....	32
REFERÊNCIAS	33
4 CAPÍTULO III – EFEITOS DE ADUBAÇÃO NITROGENADA SOBRE O DESENVOLVIMENTO E PRODUÇÃO DE GLICOSÍDEOS DITERPÊNICOS NA CULTURA DA ESTÉVIA (<i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni) NAS CONDIÇÕES DE CAMPO NA REGIÃO DO ALTO VALE DO ITAJAÍ-SC-BRASIL.....	37
4.1 INTRODUÇÃO.....	38
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	39
Desenvolvimento de plantas.....	44

Produção de Esteviosídeo e Rebaudiosídeo A.....	53
4.4 CONCLUSÕES.....	56
REFERÊNCIAS	56
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	60
REFERÊNCIAS	61
ANEXOS.....	70

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Características químicas do solo utilizado para o desenvolvimento do experimento...	14
TABELA 2. Quadrados médios da análise de variância para variáveis associadas à produção de massa seca ¹ de quatro genótipos de estévia.....	17
TABELA 3. Quadrados médios da análise de variância para variáveis associadas à avaliação quantitativa de crescimento ¹ de quatro genótipos de estévia.	17
TABELA 4. Médias por genótipo para as variáveis associadas à produção de massa seca ¹	18
TABELA 5. Médias por genótipo para as variáveis associadas à avaliação quantitativa de crescimento ¹	19
TABELA 6. Quadrados médios da análise de variância para cinco variáveis associadas ao acúmulo de glicosídeos de esteviol de quatro genótipos de estévia. Est (Esteviosídeo), Reb (Rebaudiosídeo A).....	20
TABELA 7. Médias por genótipo para as quatro variáveis associadas ao acúmulo de glicosídeos de esteviol. Est (Esteviosídeo), Reb (Rebaudiosídeo A).	20
TABELA 8. Características químicas do solo utilizado como substrato.	28
TABELA 9. Produção de massa seca de folhas, de caule e total, comprimento do maior ramo, índice de área foliar, nitrogênio no tecido foliar, número de ramos secundários e terciários, para os genótipos e doses de adubação nitrogenada testadas. IFC, Rio do Sul, SC, Brasil, 2014/2015....	31
TABELA 10. Concentração de esteviosídeo e rebaudiosídeo A (mg.g ⁻¹) e relação Rebaudiosídeo A/Esteviosídeo em folhas de genótipos de estévia após aplicação de doses de nitrogênio. IFC Rio do Sul, SC, Brasil, 2014/2015.....	40
TABELA 11. Características químicas do solo utilizado para o desenvolvimento do experimento.	47
Tabela 12. Médias por doses de adubação nitrogenada para as variáveis associadas à produção de massa seca ¹	50
Tabela 13. Médias por dose de adubação nitrogenada para as variáveis associadas à avaliação quantitativa de crescimento.	53
Tabela 14. Médias por dose de adubação nitrogenada para as quatro variáveis associadas ao acúmulo de glicosídeos de esteviol. Est (Esteviosídeo), Reb A (Rebaudiosídeo A).....	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas dos glicosídeos diterpênicos Esteviosídeo e Rebaudiosídeo A. Fonte Brandle <i>et al.</i> (2007).....	6
Figura 2. Rota de biossíntese de esteviosídeo e rebaudiosídeo A. Fonte Brandle <i>et al.</i> (2007).	7
Figura 3 - Produção de mudas de estêvia Fonte: Debarba, 2014.	16
Figura 4 - Área experimental para avaliação de genótipos. Fonte: Debarba, 2014.	16
Figura 5 - Metodologia para determinação de área foliar. Fonte Debarba, 2014. Error! Bookmark not defined.	
Figura 6 - Área experimental referente a avaliação de doses de adubação nitrogenada a campo. Fonte: Debarba, 2015.	41
Figura 7. Produção de massa seca total, de folhas e de caule do genótipo de estêvia submetido a dosagens de N; IFC, Campus Rio do Sul, SC, Brasil, 2015/2016.	47
Figura 8. Número de ramos secundários e terciários do genótipo de estêvia submetido a dosagens de N; IFC, Campus Rio do Sul, SC, Brasil, 2015/2016.....	48
Figura 9. Área foliar total do genótipo de estêvia submetido a dosagens de N; IFC, Campus Rio do Sul, SC, Brasil, 2015/2016.	52
Figura 10. Índice de área foliar e Razão de Peso das Folhas do genótipo de estêvia submetido a dosagens de N; IFC, Campus Rio do Sul, SC, Brasil, 2015/2016.	52
Figura 11. Produção por hectare de esteviosídeo e rebaudiosídeo A do genótipo de estêvia submetido a dosagens de N; IFC, Campus Rio do Sul, SC, Brasil, 2015/2016.	55

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Quadrados médios da análise de variância para variáveis associadas à produção de massa seca de quatro genótipos de estévia.	70
Anexo 2. Quadrados médios da análise de variância para variáveis associadas à avaliação quantitativa de crescimento de quatro genótipos de estévia.	70
Anexo 3. Quadrados médios da análise de variância para cinco variáveis associadas ao acúmulo de glicosídeos de esteviol de quatro genótipos de estévia. Est (Esteviosídeo), Reb (Rebaudiosídeo A).	70

RESUMO

A estêvia (*Stevia rebaudiana* Bertoni), planta perene, nativa da região da serra do Amambai, região localizada entre o Brasil e o Paraguai, pertence à família das Asteraceae e produz dois metabólitos secundários de interesse econômico, o esteviosídeo (Est) e o rebaudiosídeo A (Reb A). Esses metabólitos são, respectivamente, 300 e 450 vezes mais doces que a sacarose e apresentam propriedades antiácida, cardiotônico, anticárie, propriedade antirotavírus, atividade antimicrobiana, antioxidante, efeitos anti-hiperglicêmico e insulínotropicos que ajudam no tratamento de diabetes tipo 2 e estimulante da secreção de insulina atuando sobre as células β do pâncreas. Na região do Alto Vale do Itajaí a cultura da estêvia pode vir a ser uma alternativa viável a cultura do fumo, para tanto, necessita-se de genótipos adaptados e produtivos para a região. O objetivo desse trabalho foi avaliar a produção de biomassa, acúmulo de Esteviosídeo e Rebaudiosídeo A na região do Alto Vale do Itajaí – Santa Catarina - Brasil, em dois experimentos, um avaliando quatro genótipos inéditos fornecidos pela EMBRAPA-CENARGEN e um com avaliação de doses de adubação nitrogenada a campo. O experimento com avaliação de genótipos foi implantado em dezembro de 2014 com espaçamento de 25 cm entre plantas e 50 cm entre linhas resultando em uma população de 80.000 plantas.ha⁻¹. O experimento foi conduzido a campo nas dependências do Sítio São Miguel, Lontras, SC, Brasil. Os tratamentos foram quatro genótipos, G4; G8; G9 e G12, oriundos da EMBRAPA, CENARGEN. O delineamento experimental utilizado foi de blocos ao acaso, com quatro repetições. O experimento com doses de adubação nitrogenada (0, 65, 135, 200 e 270 kgN.ha⁻¹), sendo realizado a campo, foi implantado em dezembro de 2015 com espaçamento de 25 cm entre plantas e 50 cm entre linhas resultando em uma população de 80.000 plantas. ha⁻¹. Foram avaliados nos diferentes experimentos a produtividade de massa seca de folhas, índice de área foliar, área foliar específica, teores de Est e Reb A, razão Reb A.Est⁻¹, produtividade de Est e Reb A. Os genótipos avaliados nas condições de solo e clima do Alto Vale do Itajaí, em situação de fotoperíodo em declínio, não apresentaram padrão químico exigido pela indústria. Na avaliação de genótipos, nas variáveis massa seca total, área foliar total, índice de área foliar, razão de área foliar e área foliar específica o genótipo G12 foi superior em relação aos demais. Na variável massa seca de folhas os genótipos G4 e G12 foram iguais, sendo superiores aos demais, apresentando produção de 755,6 e 836,4 kg.ha⁻¹ respectivamente. O teor de esteviosídeo foi superior no genótipo G12 (200,07 mg.g⁻¹). Os genótipos G8 e G9 foram iguais quanto ao teor de rebaudiosídeo A, apresentando 64,77 e 49,05 mg.g⁻¹ respectivamente. A razão Reb.Est⁻¹ foi superior no genótipo G8 (0,44 g.g⁻¹). As diferentes doses de adubação nitrogenada não afetaram as variáveis relacionadas ao acúmulo de massa seca no genótipo G8 cultivado em condições de fotoperíodo em declínio nas condições de campo do Alto Vale do Itajaí (SC). Os níveis de adubação nitrogenada não afetaram os teores de esteviosídeo e rebaudiosídeo A, a produtividade de esteviosídeo e rebaudiosídeo A e a razão de rebaudiosídeo A/esteviosídeo no G8 cultivado em condições de fotoperíodo decrescente a campo na região do Alto Vale do Itajaí (SC).

Palavras Chave: *Stevia rebaudiana*, Genótipos, Estevisídeo, Rebaudiosídeo A, Biomassa, Adubação Nitrogenada.

ABSTRACT

The stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni), a perennial plant native from the Amambai mountain range, a region located between Brazil and Paraguay, belongs to the Asteraceae family and produces two secondary metabolites of economic interest, stevioside (Est) and rebaudioside A (Reb A). These metabolites are respectively, 300 and 450 times sweeter than sucrose and presents antacid, cardiogenic, antiarthritic properties, anti-rotavirus property, antimicrobial activity, antioxidant, antihyperglycemic and insulinotropic effects that aid in the treatment of type 2 diabetes and is a secretory stimulant of insulin acting on β -cells of the pancreas. In the Alto Vale do Itajaí region, stevia cultivation can be a viable alternative to tobacco cultivation. Therefore, adapted and productive genotypes are needed for the region. The objective of this work was to evaluate the biomass production and accumulation of Stevioside and Rebaudioside A in the Alto Vale do Itajaí region - Santa Catarina - Brazil, in two experiments: one evaluating four unpublished genotypes provided by EMBRAPA-CENARGEN and one with nitrogen fertilization rates to field. The experiment with genotype evaluation was implemented in December 2014 with a spacing of 25 cm between plants and 50 cm between rows resulting in a population of 80,000 plants.ha⁻¹. The experiment was conducted in the field at São Miguel Farm, in Lontras, SC, Brazil. The treatments were four genotypes, G4; G8; G9 and G12, originating from EMBRAPA, CENARGEN. The experimental design was a randomized block design, with four replications. The experiment with doses of nitrogen fertilization (0, 65, 135, 200 and 270 kgN.ha⁻¹), was carried out in the field and was implanted in December of 2015 with spacing of 25 cm between plants and 50 cm between rows resulting in a population of 80,000 plants. ha⁻¹. The leaf dry mass, foliar area index, specific leaf area, Est and Reb A contents, Reb A.Est⁻¹ ratio, Est and RebA yield were evaluated in the different experiments. The genotypes evaluated under the conditions of soil and climate of the Alto Vale do Itajaí region, in a declining photoperiod, did not present a chemical standard required by the industry. In the evaluation of genotypes, in the variables total dry mass, total leaf area, leaf area index, leaf area ratio and specific leaf area, genotype G12 was superior in relation to the others. In the variable leaf dry mass, genotypes G4 and G12 were the same, being superior to the others, presenting production of 755.6 and 836.4 kg.ha⁻¹, respectively. The stevioside content was higher in the G12 genotype (200.07 mg.g⁻¹). Genotypes G8 and G9 were the same for rebaudioside A, presenting 64.77 and 49.05 mg.g⁻¹, respectively. The Reb.Est⁻¹ ratio was higher in genotype G8 (0.44 g.g⁻¹). The different doses of nitrogen fertilization did not affect the variables related to the accumulation of dry mass in G8 genotype cultivated under declining photoperiod conditions in the Alto Vale do Itajaí (SC) field conditions. Nitrogen fertilization levels did not affect stevioside and rebaudioside A, stevioside and rebaudioside A, and rebaudioside A / stevioside ratio in G8 cultivated under field conditions in the Alto Vale do Itajaí (SC).

Keywords: *Stevia rebaudiana*, Genotypes, Stevioside, Rebaudioside A, Biomass, Nitrogen Fertilization.

1 INTRODUÇÃO

A estévia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) planta nativa da região que compreende a divisa do território brasileiro com o paraguaio, mais específico à região da Serra do Amambá (GIUFFRÉ *et al.*, 2013), apresenta potenciais para ser utilizada na indústria alimentícia e farmacológica. Esses potenciais se devem principalmente a presença de metabólitos secundários pertencentes ao grande grupo dos terpenos, onde os glicosídeos diterpênicos majoritários são o esteviosídeo e rebaudiosídeo A (MONDAÇA *et al.*, 2012; ESPITA *et al.*, 2009; JARMA *et al.*, 2006). A extração desses metabólitos secundários pela indústria visa a elaboração de edulcorantes dietéticos, não calóricos e não fermentativos. Comparativamente o esteviosídeo e o rebaudiosídeo A apresentam poder edulcorante de 300 a 400 vezes superior à sacarose, e não apresentando os problemas deletérios do açúcar em questão. Esse alto efeito edulcorante se deve as moléculas de glicosos presentes nas moléculas de esteviosídeo e rebaudiosídeo, no entanto, segundo Geuns (2003), não foram encontradas enzimas no trato digestivo de animais e homens capazes de degradar os diterpenos de esteviol.

Atualmente a China detém a maior produção de estévia, abrangendo 80% da produção global dos glicosídeos diterpênicos. Segundo Ankit (2014) se estimavam que a renda gerada pela venda dos metabólitos secundários majoritários da estévia deva ter chegado à margem de US\$ 11 bilhões.

A produção nacional de estévia é insipiente, insuficiente para atender a demanda por esteviosídeo e rebaudiosídeo A. Reflexos da baixa produção nacional são os gastos com importação que chegaram a US\$ 8 milhões no ano de 2013 (BRASIL, 2014).

Com essas potencialidades, a estévia é uma cultura promissora para o cultivo em pequenas propriedades da região sul do Brasil, em especial a região do Alto Vale do Itajaí.

Embora o cultivo de estévia possa contribuir para a geração de renda e promoção da diversificação da produção de pequenas propriedades na macrorregião do Alto Vale do Itajaí há necessidade de mais pesquisas quanto à avaliação de genótipos adaptados, tratamentos culturais como efeitos de adubação mineral e orgânica.

O presente trabalho objetivou avaliar o desenvolvimento, rendimento e produção de esteviosídeo e rebaudiosídeo A na estévia da região do Alto Vale do Itajaí, submetidas a diferentes doses de nitrogênio e a avaliação de novos genótipos.

Para atingir estes objetivos foram realizados três experimentos cujos resultados são apresentados na presente tese na forma de capítulos.

No capítulo I é apresentada uma breve revisão sobre o histórico da cultura, descrição botânica, uso e propriedades nutraceuticas e efeitos colaterais.

O capítulo II apresenta o experimento com avaliação de novos genótipos na região do Alto Vale do Itajaí. O experimento foi desenvolvido no Sítio São Miguel, localizado em Lontras, Santa Catarina - Brasil. O Trabalho teve como objetivo avaliar quatro diferentes genótipos de estévia fornecidos pela EMBRAPA - Cenargen sobre os aspectos de produção de massa seca e glicosídeos de esteviol por hectare, teor de glicosídeos diterpênicos e razão entre rebaudiosídeo A/esteviosídeo.

O capítulo III apresenta o experimento desenvolvido a campo nas dependências da área experimental do IFC – Campus Rio do Sul. Objetivou-se, neste trabalho, avaliar a resposta da cultura da estévia a campo submetido a diferentes doses de nitrogênio em cobertura, nas condições de solo e clima do Alto Vale do Itajaí. No capítulo V são apresentadas as considerações finais sobre este trabalho.

2 CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HISTÓRICO

A estévia (*Stevia rebaudiana* Bertoni), planta herbácea semiperene, que cresce espontaneamente no Brasil e Paraguai, era utilizada com objetivos edulcorantes e contraceptivos pelo povo Guarani. Essa erva é chamada por Ka'a He'e (erva doce) na língua guarani e vem sendo utilizada por essa etnia a várias gerações (GIUFFRÉ *et al.*, 2013).

No ato de colonização das Américas pelos espanhóis, essa erva foi relatada como adoçante de remédios, como por exemplo, o mate cozido usado pelos Guaranis (YADAV, 2011). Mais tarde, no século 19, o naturalista Suíço radicado no Paraguai, Moises Santiago Bertoni, obtendo informação da planta de ervateiros e índios, a classificou erroneamente como *Eupatorium rebaudianum* sp. Em homenagem ao químico paraguaio Ovídio Rebaudi. O correto gênero da planta foi determinado na Inglaterra, onde se constatou que a planta pertencia ao gênero *Stevia* em publicação no Kew Bulletin em 1901(EMBRAPA, 2004).

Nos anos da década de 20 do século passado, o Ministério da Agricultura do governo paraguaio enviou sementes aos governos dos Estados Unidos e Polônia. A escassez de açúcar (Sacarose) gerada pelas grandes guerras mundiais forçaram muitos governos europeus a procurarem por alternativas ao açúcar de cana e beterraba. Nesse contexto o Jardim Botânico Real em 1941 propõem como alternativa viável para a substituição da valiosa sacarose a estévia (EMBRAPA, 2004).

Os estudos feitos pelos japoneses na década de 70 aumentaram os interesses pela planta. A tendência mundial é o aumento do consumo de adoçantes a base de estévia principalmente pelos benefícios promovidos a saúde, demonstrados principalmente pelos estudos da indústria farmacológica (ANKIT, 2014).

2.2 DESCRIÇÃO BOTÂNICA

Pode-se afirmar que o gênero *estévia* ocorre somente no continente Americano com mais de 200 espécies identificadas, dessas, somente a *S. rebaudiana* e *S. aristata* apresentam princípios edulcorantes. Segundo Frederico *et al.* (1996), outras espécies do gênero *Stevia* apresentam potencial para a produção de substâncias de interesse econômico.

A *estévia* (*S. rebaudiana* Bert.) pertence à família Compositae (Asteraceae) caracterizando-se por ser uma planta herbácea semiperene, talo ereto, sublenhoso, pubescente. Durante seu desenvolvimento inicial não possui ramificações, apresentando perfilhamento depois do primeiro ciclo vegetativo ou colheita, chegando a produzir até 20 perfilhos na touceira. Seu porte chega a 90 cm de altura, chegando a 100 cm nas áreas tropicais. Apresenta sistema radicular pivotante, filiforme, distribuindo-se nos primeiros centímetros do perfil do solo (EMBRAPA, 2004).

As folhas são elípticas, ovais e lanceoladas. Apresentam-se em disposição oposta no estágio juvenil e alternas no estágio de maturação fisiológica (pré-floração) (EMBRAPA, 2004).

As plantas de *estévia* apresentam flores hermafroditas, pequenas e brancas. A corola é tubular, pentalobulada, em capítulos pequenos terminais ou axilares, agrupadas em panículas Corimbosas (SHOCK, 1982).

A planta apresenta autoincompatibilidade (protandria), tendo necessidade de polinização promovida por insetos (polinização entomófila); sistema esporofítico e classificada com apomítica obrigatória (MONTEIRO, 1982). Seu fruto é um aquênio que pode ser claro (estéril) ou escuro (fértil) tendo sua disseminação promovida pelo vento (YADAV, 2011). Planta de dia curto, com fotoperíodo crítico entre 12 e 13 horas (EMBRAPA, 2004).

2.3 GLICOSÍDEOS DITERPÊNICOS

As preocupações referentes ao bem estar e a procura por alimentos saudáveis é uma constante na sociedade moderna. Uma alimentação saudável baseada em alimentos que tenham altos valores biológicos e livres de substâncias carcinogênicas tem crescido em demanda, principalmente pela indústria alimentícia, que é forçada a atender as exigências do mercado. Com o objetivo de ofertar alimentos de melhor valor biológico e que não proporcionem efeitos deletérios à saúde, a procura por edulcorantes naturais se justifica. Hoje, a comunidade científica tem conhecimento de cerca de 80 substâncias naturais edulcorantes. Entre as principais destacam-se a glicirrizina, a neo-hesperidina, as di-hidrochalconas, o esteviol e suas variáveis (esteviosídeo e rebaudiosídeo-A), a taumatina, o gaudichaudiosídeo, a periandrina, os pterocariosídeos, o mogrosídeo, os abrusosídeos, os ciclocariosídeos e a seliqueaína.

Os edulcorantes naturais que atualmente possuem grande potencial para serem produzidos e comercializados são o esteviosídeo e o rebaudiosídeo, ambos produzidos pela planta estêvia (*S. rebaudiana* Bert.) (Figura 1).

O esteviosídeo e o rebaudiosídeo A apresentam poder edulcorante 300 e 400 vezes superior à sacarose, e são considerados de baixo índice glicêmico (ESPITA *et al.*, 2009). O alto poder edulcorante está associado à presença de molécula de glicose aderidas à molécula (Figura 1). Embora haja a presença de moléculas de glicose, as mesmas não são liberadas para a absorção pelo organismo humano. Segundo Geuns (2003), não foram encontradas enzimas digestivas em humanos, ratos e hamsters capazes de degradar o esteviosídeo e o rebaudiosídeo A, sendo essas moléculas eliminadas intactas nas fezes.

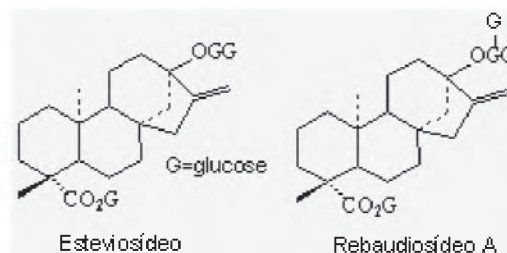


Figura 1. Estruturas dos glicosídeos diterpênicos Esteviosídeo e Rebaudiosídeo A. Fonte Brandie e Telmer (2007).

A relação entre esteviosídeo e rebaudiosídeo A é variável importante a ser analisada em novos genótipos de estévia. A indústria, segundo Mota *et al.*, (2011,) tem preferência por genótipos que apresentem essa relação próxima a 1, isso porque o esteviosídeo apresenta baixa solubilidade em água e sabor residual amargo enquanto rebaudiosídeo A apresenta solubilidade e não apresenta sabor residual.

Os edulcorantes concentram-se em maior quantidade nas folhas, são glicosídeos diterpenos sintetizados na mesma rota do ácido giberélico a partir do mevolato (Figura 2) (OROZCO *et al.*, 2010; HSIEH & GOODMAN, 2005; GUEVARA-GARCÍA *et al.*, 2005; RICHMAN *et al.*, 2005; KASAHARA *et al.*, 2002; RICHMAN *et al.*, 1999). Vários autores tem indicado que o caureno, precursor dos referidos hormônios, se converte em esteviol no retículo endoplasmático (BRANDLE *et al.*, 2007; GEUNS, 2003; TOTTE *et al.*, 2003; TOTTE *et al.* 2000; BRANDLE *et al.*, 2002).

Outros compostos já foram isolados da estévia, como a rutina, flavonóide que possui aplicações terapêuticas como fortalecedora de vasos capilares e propriedades cardiotônicas (SUZUKI *et al.*, 1976), fitosteróis (NABETA *et al.*, 1976), gomas (arábica e karaya) (ALVAREZ, 1984), óleos essenciais (TSANAVA *et al.*, 1989), derivados diterpênicos (jhanol, austroinulina, labdano, esterebinas, etc) (SHOLICHIN *et al.*, 1980; DARISE *et al.*, 1983; OSHIMA *et al.*, 1988), além de substâncias antibacterianas (ALVAREZ, 1984).

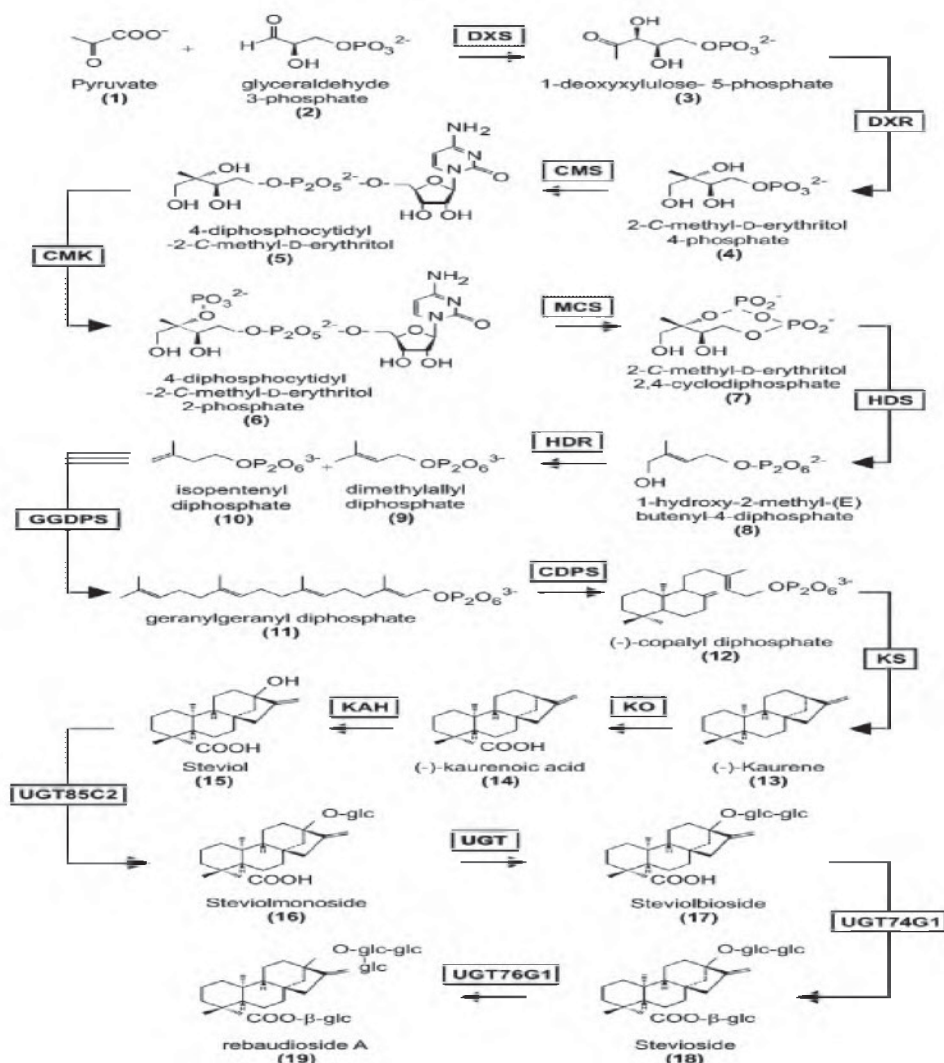


Figura 2. Rota de biossíntese de esteviosídeo e rebaudiosídeo A. Fonte Brandie e Telmer (2007).

2.4 USOS E PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS

O esteviosídeo, um glicosídeo diterpeno, apresenta potenciais de uso na indústria alimentícia, como edulcorante natural, e também, na indústria de fármacos. Descobriu-se que o esteviosídeo apresenta atividade antiácida, cardiotônico, anticárie (BRANDLE, 1998), propriedade antirotavírus (TAKAHASHI *et al.*, 2001), atividade antimicrobiana (TADHANI *et al.*, 2006), antioxidante (TADHANI *et al.*, 2007), efeitos anti-hiperglicêmico e insulíntrópicos que ajudam no tratamento de diabetes tipo 2 (CHEN *et al.*, 2005; GREGERSEN *et al.*, 2004; REZIWANGGU *et al.*, 2004), estimulante da secreção de insulina atuando sobre as células β do pâncreas (JEPPESEN *et al.*, 2000; JEPPESEN *et al.*, 2002).

REFERÊNCIAS

- ANKIT. Global Stevia / Stevia rebaudiana Market (2013-2018): By Types (Liquid e Powdered); By Application (Dairy, Bakery, Canned Food, Beverages e Others) and By Geography. IndustryARC. 2014.
- ALVAREZ, M. *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni: estado atual do conhecimento. Maringá. **FUEM**. 118p. 1984.
- BRANDLE, J.E.; STARRATT, A.N.; GIJZEN, M. *Stevia rebaudiana*: Its agricultural, biological, and chemical properties. **Canadian Journal of Plant Science**, v.78, p.527-536, 1998.
- BRANDLE, J. *et al.* Leaf ESTs from *Stevia rebaudiana*: A resource for gene discovery in diterpeno synthesis. **Plant Mol Biol**. v.50, p.613-622, 2002.
- BRANDLE, J.; TELMER, P.G. Steviol glycoside biosynthesis. **Phytochemistry**, v.68, p.1855-1863, 2007.
- BRASIL. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Secretaria do Comércio Exterior. Programa Alice Web. 2014. Disponível em <<http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br/>>. Acessado em 04/05/2017.
- CHEN, T.H. *et al.* Mechanism of the hypoglycemic effect of stevioside, a glycoside of *Stevia rebaudiana*. **Planta Med**. v.71, p.108-113, 2005.
- DARISE, M. *et al.* Chemical constituents of iowers of *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Agricultural and Biological Chemistry**. v.47, n. 1, p. 133-135, 1983.
- EMBRAPA. **Sistema de produção 5: Estévia**. 1ª. ed. Maringá, PR, Brasil, Steviafarma Industrial S/A, 2004. 55p.
- ESPITA, M.C.; MONTOYA, R.B.; ANTECIO, L.S. Rendimiento de *Stevia rebaudiana* BERT. Bajo tres arreglos poblacionales em el Sinú Medio. **Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica**, v.12, n.1, p.151-161, 2009.
- FREDERICO, A. P. *et al.* Chromosome studies in some Stevia Cav. (Compositae) species from Southern Brazil. **Braz.J. Genet**, v.19, p.605-609, 1996.
- GEUNS, J.M.C. Stevioside. **Phytochemistry**. v.64, p.913-921, 2003.
- GEUNS, J.M.C. *et al.* Metabolismo f stevioside in pigs and intestinal absorption characteristics of stevioside, rebaudiosídeo A and steviol. **Food Chem Toxicol**. v.41, p.1599-1607, 2003.

GIUFFRÉ, L.; ROMANIUK, R.; CIARLO, E. Stevia, ka'a he'e, wild sweet herb from South America - An overview. **Emir. J. Food Agric.**, v.25, n.10, p.746-750, 2013.

GREGERSEN, S. *et al.* Antihyperglycemic effects of stevioside in type 2 diabetic subjects. **Metabolism**. v.53, n.1, p.73-76, 2004.

GUEVARA-GARCÍA, A. *et al.* Characterization of the Arabidopsis clb6 mutant illustrates the importance of Posttranscriptional regulation of the Methyl-D-Erythritol 4-phosphate Pathway. **Plant Cell**. v.17, n.2, p.628-643, 2005.

HSIEH, M.; GOODMAN, H. The Arabidopsis IspH homolog is involved in the plastid nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. **Plant Physiol**. v.138, n. 2, p.641-653, 2005.

JARMA, A.; RENGIFO, T.; ARAMÉNDIZ-TATIS, H. Fisiología de estevia (*Stevia rebaudiana*) em función de La radiación en el caribe colombiano. II. Análises de crecimiento. **Agronomia Colombiana**, v.24, n.1, p.38-47, 2006.

JEPPESEN, P. *et al.* Stevioside acts directly on pancreatic 13 cells to secrete insulin: Actions independent of cyclic adenosine monophosphate and adenosine triphosphate-sintese K⁺-Channel Activity. **Metabolism**. v.149, n. 2, p.208-214, 2000.

JEPPESEN, P. *et al.* Stevioside induces antihyperglycemic, insulinotropic and glucagonostatic effects *in vivo*: Studies in the diabetic Goto-Kakizaki (GK) rats. **Phytomedicine**. p.9-14, 2002.

KASAHARA, H. *et al.* Contribution of the mevalonate and methylerythritol phosphate Pathway to the biosynthesis of gibberellins in Arabidopsis. **Journal Biol. Chem**. v.277, n.47, p.45188-45194, 2002.

MONDAÇA, R. L. *et al.* *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. **Food Chemistry**, v. 132, n. 3, p. 1121–1132. 2012.

MOTA, TR. *et al.* Seleção de clones de elite de *Stevia rebaudiana*(Bert.) Bertoni com ênfase no teor do rebaudiosídeo A e a atividade antioxidante. Anais eletrônicos. VII EPCC – ENCONTRO INTERNACIONAL DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA CESUMAR. CESUMAR – Centro Universitário de Maringá, Editora CESUMAR, Maringá, Paraná, Brasil. Disponível em http://www.cesumar.br/prppge/pesquisa/epcc2011/anais/thatiane_rodrigues_MOTA_3.pdf. Acesso em: 20 jun. 2015.

MONTEIRO, R. Taxonomía e biología da reprodução de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. I Seminario Brasileiro sobre *Stevia rebaudiana* Bertoni. IV 1. Resumos ITAL Campinas 9/82. **Instituto de Tecnología de Alimentos**, Sao Paulo. Pagliosa, 1982

NABETA, K.; KASAI, T.; SUGISAWA, H. Phytosterol from the callus of *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Agricultural and Biological Chemistry**. v.40, n.10, p.2103-2104, 1976.

OROZCO, A.J.; CAMACHO, M.E.; FISCHER, G. Síntesis de esteviosidos em estevia (*Stevia rebaudiana* BERT). **Acta bilogica Colombiana**, v.15, n.1, p.289-294, 2010.

OSHIMA, Y.; SAITO, I.; HIKINO, H. Sterebins E, F, Oand II, diterpenoids of *Stevia rebaudiana* leaves. **Phytochemistry**. v.27, n.2, p.624-626, 1988.

REZIWANGGU, A. *et al.* Rebaudioside A potently stimulates insulin secretion from isolated mouse islets: Studies on the dose-, glucose-, and calcium-dependency. **Metabolism**. v.53, n.10, p.1378-1381, 2004.

RICHMAN, A.S. *et al.* Diterpene synthesis in *Stevia rebaudiana*: recruitment and up-regulation of key enzymes from the gibberellin biosynthetic pathway. **The Plant Journal**, v.19, n.4, p.411-421, 1999.

RICHMAN, A. *et al.* Functional genomics uncovers three glucosyltransferases involved in the synthesis of the major sweet glucosides of *Stevia rebaudiana*. **The Plant Journal**, v.41, p. 56-67, 2005.

SHOCK, C. C. Experimental Cultivation of Rebaudi's Stevia in California. **Agronomy Prog** No. 122. Univ. of California, Davis, 1982.

SHOLICHIN, M. *et al.* Labdane-Typediterpenes from *Stevia rebaudiana*. **Phytochemistry**. Oxford, v.19, p.326-327, 1980.

SUZUKI, H. *et al.* Isolation and identification of rutin from cultured cells of *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Agricultural and Biological Chemistry, Tokyo**, v.40, n.4, p.819-820, 1976.

TADHANI, M.B.; SUBHASH, R. *In vitro* antimicrobial activity of *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v.5, n.1, p.557-560, june, 2006.

TADHANI, M.B.; PATEL, V.H.; SUBHASH, R. *In vitro* antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* leaves and callus. **Journal of food composition and analysis**, v.20, p.323-329, 2007.

TAKAHASHI, K., *et al.* Analysis of anti-rotavirus activity of extract from *Stevia rebaudiana*. **Antiviral Research**, v.49, p.15-24, 2001.

TOTTÉ, N.; CHARON, L.; ROHMER, M.; COMPERNOLLE, F.; BABOEUF, I.; GEUNS, J. Biosynthesis of the diterpenoid steviol, an entkaurene derivative from *Stevia rebaudiana* Bertoni, via the Methylerythritol Phosphate pathway. **Tetrahedron Lett**, v.41, p.6407-6410, 2000.

TOTTÉ, N. *et al.* Cloning and heterologous expression of early genes in Gibberellin and steviol biosynthesis via the Methylerythritol phosphate pathway in *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Can. Journal Bot**, v.81, n.5, p.517-522, 2003.

TSANAVA, V.P.; SARDZHVELADZE, G.P.; KHAREBAVA, L.G. Studies on the volatile of *Stevia rebaudiana*. **Subtropicheskie Kul'tury**, v.3, p.73-77, 1989.

YADAV, A.K. *et al.* A review on the improvement of stevia [*Stevia rebaudiana* Bertoni]. **Canadian Journal of Plant Science**, v.91, p.1-27, 2011.

3 CAPÍTULO II – DESEMPENHO FENOTÍPICO DE QUATRO GENÓTIPOS DE ESTÉVIA (*Stevia rebaudiana* Bert.) NA REGIÃO DO ALTO VALE DO ITAJAÍ, SANTA CATARINA, BRASIL

RESUMO: A avaliação de quatro genótipos de estévia para a produção de biomassa, teor e produtividade de esteviosídeo e rebaudiosídeo A foi realizada na região do Alto Vale do Itajaí, estado de Santa Catarina em condições de fotoperíodo em declínio. O experimento foi conduzido a campo nas dependências do Sítio São Miguel, Lontras, SC, Brasil. Os tratamentos foram quatro genótipos, G4; G8; G9 e G12, oriundos da EMBRAPA, CENARGEN. O delineamento experimental utilizado foi de blocos ao acaso, com quatro repetições. Nas variáveis massa seca total, área foliar total, índice de área foliar, razão de área foliar e área foliar específica o genótipo G12 foi superior em relação aos demais. Na variável massa seca de folhas os genótipos G4 e G12 foram iguais, sendo superiores aos demais, apresentando produção de 755,6 e 836,4 kg.ha⁻¹ respectivamente. O teor de esteviosídeo foi superior no genótipo G12 (200,07 mg.g⁻¹). Os genótipos G8 e G9 foram iguais quanto ao teor de rebaudiosídeo A, apresentando 64,77 e 49,05 mg.g⁻¹ respectivamente. A razão Reb.Est⁻¹ foi superior no genótipo G8 (0,44 g.g⁻¹). Nenhum genótipo avaliado nas condições produtivas do Alto Vale do Itajaí apresentou relação entre rebaudiosídeo A/esteviosídeo apropriado às exigências da indústria alimentícia.

Palavras-chave: *Stevia rebaudiana*, genótipos, desenvolvimento, esteviosídeo, rebaudiosídeo A.

PHENOTYPICAL PERFORMANCE OF FOUR STEVIA GENOTYPES (*Stevia rebaudiana* Bert.) IN THE ALTO VALE DO ITAJAÍ, SANTA CATARINA, BRAZIL

ABSTRACT: The evaluation of four stevia genotypes for the production of biomass, content and productivity of stevioside and rebaudioside A was carried out in the Alto Vale do Itajaí region, Santa Catarina state, under conditions of declining photoperiod. The experiment was conducted in the field at São Miguel Farm, in Lontras, SC, Brazil. The treatments were four genotypes, G4; G8; G9 and G12, originating from EMBRAPA, CENARGEN. The experimental design was a randomized block design, with four replications. In the variables total dry mass, total leaf area, leaf area index, leaf area ratio and specific leaf area, genotype G12 was superior in relation to the others. In the variable leaf dry mass, genotypes G4 and G12 were the same, being superior to the others, presenting production of 755.6 and 836.4 kg.ha⁻¹, respectively. The stevioside content was higher in the G12 genotype (200.07 mg.g⁻¹). Genotypes G8 and G9 were the same for rebaudioside A, presenting 64.77 and 49.05 mg.g⁻¹, respectively. The Reb.Est⁻¹ ratio was higher in genotype G8 (0.44 g.g⁻¹). None of the genotype evaluated in the productive conditions of the Upper Vale do Itajaí presented a Reb.Est⁻¹ ratio appropriate to the requirements of the food industry.

Key words: *Stevia rebaudiana*, development, stevioside, rebaudioside A.

3.1 INTRODUÇÃO

Atualmente a demanda mundial por edulcorantes para fins dietéticos e farmacológicos é crescente. A cultura da estévia (*Stevia rebaudiana* Bert.) contribui na oferta de substâncias com poder edulcorante com apelo natural e não carcinogênico (RENWICK, 2008; ANTON *et al.*, 2010). A estévia, planta pertencente à família das Asteraceae, nativa do Brasil e Paraguai, vem sendo utilizada largamente pelas suas propriedades medicinais e dietéticas relacionadas aos seus glicosídeos de esteviol majoritários encontrados em suas folhas, o esteviosídeo e o rebaudiosídeo A, esses 300 vezes mais doces que a sacarose (ESPITA *et al.*, 2009; LEMUS-MONDACA *et al.*, 2012). Adicionalmente possuindo alta demanda internacional por países asiáticos, europeus e americanos.

Os dois glicosídeos diterpênicos majoritários encontrados nas folhas de estévia, inicialmente são sintetizados pela mesma rota do ácido giberélico (OROZCO *et al.*, 2010). A diferença básica na rota de síntese, quando comparada com ao ácido giberélico, é a ação da enzima ent-caurenóico hidroxilase, que dá origem ao esteviol.

A cultura da estévia apresenta potencialidade para ser cultivada na região do Alto vale do Itajaí, Santa Catarina. O objetivo principal é gerar renda aos pequenos agricultores e proporcionar alternativas viáveis à cultura do fumo e cebola. Com a demanda crescente pelos glicosídeos de esteviol, justificam-se os estudos voltados à seleção de novos genótipos que apresentem alto potencial produtivo, adaptação local, e relações adequadas entre esteviosídeo/rebaudiosídeo A, que são exigidas pela indústria (MOTA *et al.*, 2011).

Estudo desenvolvido por Yadav *et al.*, (2011), demonstrou um potencial de rendimento de 1,5 a 2,0 t/folhas secas/ha/ano com um teor que varia de 6 a 15 % de glicosídeos de esteviol.

Os tratos culturais relacionados à produção da estévia apresentam um grande potencial gerador de empregos no meio rural, e viabilizam alternativas para a permanência do homem no campo (ESPITA *et al.*, 2009; JARMA *et al.*, 2006) . Na região

Sul do Brasil, trabalhos elaborados pela Universidade Federal do Paraná com acessos fornecidos pela EMBRAPA, - CENARGEN, que foram coletados em regiões diferentes do Brasil e não avaliados, demonstraram ser possível o cultivo da estêvia na região metropolitana da grande Curitiba, PR (FRANCISCO, 2015). Assim, justificam-se pesquisas exploratórias dos acessos fornecidos pela EMBRAPA – CENARGEN em áreas com condições de solo e clima distintos, como os encontrados na região do Alto Vale do Itajaí, SC.

Os estudos de seleção de genótipos adaptados são importantes para diferentes zonas produtoras pelo fato de avaliar suas potencialidades produtivas em condições locais, e também, verificar as interações com as práticas culturais, a competição entre plantas e doenças as quais serão submetidos (ESPITA *et al.*, 2009).

Tendo em conta a falta de informações agronômicas sobre a cultura da estêvia e genótipos adaptados à região do Alto Vale do Itajaí, SC, o presente teve como objetivo de avaliar quatro diferentes genótipos fornecidos pela EMBRAPA - Cenargen sobre os aspectos de produção de massa seca e glicosídeos de esteviol por hectare, teor de glicosídeos diterpênicos e razão entre rebaudiosídeo A/esteviosídeo.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido nas dependências do Sítio São Miguel, localizado em Lontras, Santa Catarina, Brasil, com as coordenadas 27° 9' 58", latitude sul, 49° 32' 31", latitude oeste. A altitude local é de 475 m. O clima local, segundo a classificação de Köppen, é descrito como Cfa, clima mesotérmico úmido com verões quentes. Os dados climáticos da ocasião do experimento estão dispostos na Tabela 1.

Tabela 1. Temperatura, umidade e fotoperíodo durante o experimento. Rio do Sul 2014/2015

Dados Climáticos	Dezembro	Janeiro	Fevereiro	Março
Temperatura Máxima (°C)	30,7	30,9	30,6	26,4
Temperatura Mínima (°C)	13,9	15,9	15,6	12,2
Temperatura Média (°C)	20,5	20,5	20,9	18,3
Umidade relativa do Ar (%)	89	91	93	94
Fotoperíodo (h)	13,72	13,68	13,24	12,57

Fonte: IFC – Rio do Sul, estação meteorológica, 2014.

O solo da área experimental utilizada para a implantação do experimento foi classificada como Argissolo Amarelo distrófico típico (EMBRAPA, 2006). Os dados da análise do solo se encontram na Tabela 2.

TABELA 2. Características químicas do solo utilizado para o desenvolvimento do experimento.

pH	Al ³⁺	H ⁺ + Al ³⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	CTC	K ⁺	P	M.O	V
SMPcmol dm ⁻³mg dm ⁻³		%	%
6,0	0,3	4,5	2,9	2,0	9,42	32,0	10,8	1,3	52,19

O solo foi corrigido mediante resultado da análise laboratorial e as correções embasadas no Manual de Adubação e Calagem para os Estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul (SBCS, 2004), sendo a aplicação dos corretivos fosfatados e potássicos aplicados no momento da preparação dos canteiros do experimento, 15 dias antes do transplante das mudas. Para o preparo do solo da área experimental, realizou-se a aração com enxada rotativa.

A adubação foi realizada com 90 kg.ha⁻¹ de N, 68 kg.ha⁻¹ de P₂O₅ e 110 kg.ha⁻¹ de K₂O, fornecidos respectivamente por ureia, superfosfato simples e cloreto de potássio. A aplicação da ureia foi parcelada em duas vezes, no transplante e trinta dias após o transplantio, segundo Embrapa (2004). Os quatro genótipos de estévia avaliados foram fornecidos pela EMBRAPA – CENARGEN de Brasília, DF. Os genótipos avaliados apresentam características morfológicas e produtivas distintas, comprovadas por avaliações prévias realizadas na Universidade Federal do Paraná (FRANCISCO, 2015).

As mudas foram obtidas de ramos de plantas matrizes fornecidas na Fazenda Canguiri, pertencente à Universidade Federal do Paraná, localizada no município de

Pinhais, PR, Brasil. A metodologia utilizada foi descrita por Espita *et al.* (2009) e Carvalho & Zaidan (1995) com a utilização de indutores de enraizamento AIB, na concentração de 2000 mg.L⁻¹ (Figura 3). As mudas foram produzidas em tubetes com substrato comercial (Macrofertil®) nas dependências do Instituto Federal Catarinense - Campus Rio do Sul, SC. No momento do transplante as mudas foram submetidas à quebra de dormência apical segundo recomendação da EMBRAPA (2004).



Figura 3 - Produção de mudas de estêvia Fonte: Do autor.

As mudas foram transplantadas em canteiros previamente preparados com encanteirador. O experimento foi implantado no dia 12 de dezembro de 2014 (Figura 4). O espaçamento utilizado foi 0,25 x 0,50 m gerando uma população de 80.000 plantas.ha⁻¹ (SBCS, 2004).



Figura 4 - Área experimental para avaliação de genótipos. Fonte: Do autor.

Durante todo o período de condução do experimento foram realizadas capinas com objetivo de controle de plantas espontâneas. Não foram necessários tratamentos

fitossanitários para controle de pragas e doenças. A área experimental foi irrigada nos primeiros quinze dias após a implantação do experimento.

Os tratamentos foram compostos pelos seguintes genótipos: Genótipo 4 (G4), Genótipo 8 (G8), Genótipo 9 (G9) e Genótipo 12 (G12). O delineamento utilizado foi o de blocos ao acaso, com quatro tratamentos (genótipos de estêvia) e quatro repetições. Cada parcela foi composta por 21 plantas, e a área útil, por cinco plantas. A colheita foi realizada quando as plantas estavam com 5% de florescimento (EMBRAPA, 2004), que ocorreu em períodos distintos para cada genótipo, em média 78 dias após o transplante.

Nas plantas foram avaliadas as seguintes características: massa seca de folhas (MSF), massa seca de caule (MSC), massa seca de ramos (MSR), massa seca total (MST), comprimento do ramo principal, número de ramos secundários, número de ramos terciários, área foliar (AF), índice de área foliar (IAF), área foliar específica (AFE), razão de área foliar (RAF), produtividade de esteviosídeo e rebaudiosídeo A, teores de esteviosídeo e de rebaudiosídeo A e a razão esteviosídeo/rebaudiosídeo A. As plantas da parcela útil foram cortadas a 5 cm do solo (EMBRAPA, 2004), as mesmas foram levadas ao laboratório de Fisiologia Vegetal do Instituto Federal Catarinense campus Rio do Sul, SC, com o objetivo de separar as folhas dos caules. A massa seca de folhas e caules foi determinada em balança digital, após secagem das folhas e caules a 50 °C até atingirem peso constante (ESPITA *et al.*, 2009). A determinação da altura do maior ramo foi realizada com fita métrica, enquanto a determinação de número de ramos secundários e terciários foi realizada com a simples contagem manual.

As variáveis área foliar (AF), índice de área foliar (IAF), área foliar específica (AFE), razão de área foliar (RAF) e razão de peso das folhas (RPF) foram obtidos por meio das metodologias descritas por Jarma *et al.* (2006), e Cunha *et al.* (2010).

Conforme segue:

Área foliar (AF):

A área foliar foi obtida pela metodologia de massa seca de discos foliares descrita por Cunha *et al.* (2010). Com um perfurador de área conhecida (10 mm de diâmetro) (Figura 5), por meio de punções, tomou-se 50 amostras de discos foliares e relacionou-se

a massa seca da área conhecida do disco com a massa seca de folhas, expresso em cm^2 .



Figura 5 - Metodologia para determinação de área foliar. Fonte: Do autor.

Índice de área foliar (IAF):

O índice de área foliar (IAF) é a razão entre a área foliar do dossel e a unidade de superfície projetada no solo (m^2/m^2).

$$\text{IAF} = \text{AF}_{\text{total}}/\text{AS}$$

Área foliar específica (AFE):

É a relação entre a área foliar total da planta e a massa seca total de folhas da planta ($\text{cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$).

$$\text{AFE} = \text{AF}_T/\text{MS}_{\text{folhas}}$$

Razão de área foliar (RAF):

É a razão entre a área foliar total e a massa seca total ($\text{cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$).

$$\text{RAF} = \text{AF}_T/\text{MS}_T$$

Razão de peso das folhas (RPF):

É a razão entre a massa seca de folhas e a massa seca total (g.g⁻¹)

$$RPF = MS_F/MS_T$$

Para a determinação da produção de esteviosídeo e rebaudiosídeo A foram coletadas amostras de 1g de tecidos foliares das cinco plantas da parcela útil de cada tratamento. A amostra de tecido foliar foi coletada aleatoriamente da massa total de folhas das plantas que constituíram a parcela útil. A metodologia de extração e quantificação adotada foi a descrita por Kolb *et al.* (2001), com pequenas modificações. A modificação consistiu da utilização de 0,3 mL da amostra extraída das folhas de cada tratamento acrescentando-se 0,7 mL de acetonitrila grau HPLC. As amostras de tecido foliar seco foram acondicionadas em frascos Erlenmeyer de 250 mL com 100 mL de etanol 70%. A solução foi aquecida a 70 °C e agitada por 30 minutos. Após o resfriamento, uma alíquota de 10 mL foi filtrada (papel filtro quantitativo e filtro de seringa, nylon 0,22 µm). Utilizou-se 0,3 mL da amostra extraída das folhas de cada tratamento acrescentando-se 0,7 mL de acetonitrila grau HPLC. Dessa diluição injetou-se 20 µL para posterior análise em cromatógrafo líquido de Alta eficiência, (Shimadzu CBM-10A) contendo coluna Phenomenex Luna® 5 µm NH2 100 Å, 250 x 4.6 mm. A eluição foi a temperatura ambiente, no modo isocrática utilizando solvente acetonitrila/água destilada (80:20, v/v), fluxo de 2 mL min⁻¹. A detecção foi realizada por UV em 210 nm com sensibilidade ajustada para 0.04 AUFS. As leituras foram feitas em triplicata. A quantificação de cada metabólito foi obtida pela conversão da área da curva correspondente ao tempo de retenção utilizando uma curva de calibração previamente estabelecida. A solução padrão para obtenção da curva de calibração foi composta por 1,0 g.L⁻¹ de esteviosídeo e rebaudiosídeo A em metanol (KOLB, *et al.*, 2001). A conversão é expressa em mg.g⁻¹.

Os resultados foram submetidos à análise de variância utilizando-se o programa estatístico Assistat 7.7 beta (SILVA & AZEVEDO, 2009). As variâncias dos tratamentos inicialmente foram avaliadas quanto a sua homogeneidade pelo teste de Bartlett. Todas as variáveis apresentaram as variâncias homogêneas e tiveram os efeitos dos tratamentos testados por meio do teste de F. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Desenvolvimento de Plantas

As médias entre os genótipos para as variáveis produções de massa seca total, massa seca de folhas, número de ramos secundários e terciários e comprimento do maior ramo (Tabela 3) confirmam a presença de diferenças estatísticas significativas apontadas na análise de variância (Anexo 1). O genótipo 12 apresentou superioridade aos demais na variável produção de massa seca total e massa seca de folhas foi igual ao genótipo G4, sendo estes superiores aos demais genótipos (Tabela 3). Não se observaram diferenças estatísticas entre os genótipos na variável produção de massa seca de caule (Tabela 3). Na variável comprimento do maior ramo os genótipos G12, G8 e G4 foram iguais, não diferindo entre si, apresentando superioridade em relação ao genótipo G9 (Tabela 3). Nas variáveis número de ramos secundários e número de ramos terciários o genótipo G8 foi superior aos demais.

TABELA 3. Variação das variáveis associadas à produção de massa seca em função do genótipo de *Stevia rebaudiana*.

Genótipos	MSTotal (Kg.ha ⁻¹)	MSCaule (Kg.ha ⁻¹)	MSFolhas (Kg.ha ⁻¹)	Nºramos sec	Nºramos terc	Comp. maior ramo (cm)
G4	1335,00 a b	579,40 a	755,60 a	3,10 b	47,50 b c	54,26 a
G8	1572,00 a b	1028,80 a	543,20 b	4,50 a	88,95 a	60,80 a
G9	845,20 b	495,80 a	349,40 c	3,25 b	38,80 c	41,35 b
G12	1874,40 a	1038,00 a	836,40 a	3,15 b	56,80 b	60,45 a

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Massa seca total (MS Total), Massa seca de caule (MS Caule), Massa seca de Folhas (MS Folhas), Número de ramos secundários (Nº ramos sec), Número de ramos terciários (Nº ramos terc), Comprimento do Maior Ramo (Comp. Maior ramo).

A eficiência no processo fotossintético é muito importante quando se avaliam novos genótipos de plantas, e essa eficiência pode ser medida através de várias metodologias. Rodrigues *et al.* (1998), apontam que as metodologias mais precisas são aquelas que quantificam o gás carbônico absorvido. Entretanto, existem outras metodologias de avaliação do processo fotossintético onde essas metodologias se referem à quantificação da produção de massa seca.

A variável produção de massa seca de folhas por hectare apresenta maior relevância ante a avaliação de novos genótipos de estévia já que os glicosídeos de

esteviol se encontram em maior quantidade nas folhas (OROZCO et al., 2010; HSIEH & GOODMAN, 2005). As produções de massa seca de folhas variaram de 349,40 kg. ha⁻¹ (G9) até 836,40 kg. ha⁻¹ (G12) com uma média geral entre os quatro genótipos de 621,15 kg. ha⁻¹. Esses rendimentos foram inferiores aos encontrados por Espita *et al.* (2009) nas condições de clima e solo colombianas, (1112 kg. ha⁻¹) e Serfaty *et al.* (2013), onde esse último alcançou produções de 3000 kg folhas secas por hectare.

Francisco (2015), avaliando os mesmos genótipos testados no presente trabalho na região da grande Curitiba, obteve dados de produção de massa seca de folhas de 4031,8 kg. ha⁻¹ (G9) e 3733,1 kg. ha⁻¹ (G12) no primeiro ano de cultivo. As produções inferiores no presente trabalho podem ser explicadas pela interação genótipo/ambiente, onde as condições de fotoperíodo encontradas por Francisco (2015) são mais favoráveis ao melhor desenvolvimento dos genótipos, proporcionando maior período de crescimento aos genótipos. A redução de produtividade está associada à diminuição do ciclo vegetativo ocasionado por diferenças na época de transplante das mudas, realizado no início de dezembro. Comparando os ciclos nos diferentes trabalhos, podemos observar uma diminuição de 43 dias, afetando a produtividade dos genótipos avaliados.

As mudas dos genótipos de estévia utilizadas para a implantação do presente trabalho foram produzidas a partir de ramos provenientes de plantas matrizes encontradas na fazenda Canguiri, pertencente a UFPR, localizada no município de Pinhais. Usualmente, as mudas de estévia destinadas a avaliações em experimentos são produzidas a partir de sementes (EMBRAPA, 2004), o que possibilita a produção antecipada das mudas, e consequentemente, a implantação dos experimentos pode ser realizada em períodos mais propícios ao bom desenvolvimento e acúmulo de massa seca pelos diferentes genótipos de estévia. No presente trabalho, foram utilizadas mudas proveniente de propagação vegetativa, o que acarretou atraso significativo no momento da implantação do experimento, gerando assim, menor tempo para o acúmulo de massa seca dos genótipos em decorrência do fotoperíodo em declínio (CEUNEN & GEUNS, 2013).

O plantio tardio, realizado no início de dezembro, reduziu o período de crescimento da cultura devido à diminuição do fotoperíodo, sendo a estévia cultura de dias curtos, observa-se a entrada prematura da cultura em fase reprodutiva, que neste trabalho ocorreu em média aos 78 dias após o transplante para os genótipos avaliados, diminuindo

assim, a capacidade de acúmulo de biomassa pela planta (CEUNEN & GEUNS, 2013; YADAV *et al.*, 2011).

Os rendimentos superiores encontrados por Espita *et al.* (2009), se devem a utilização de genótipos e populações de plantas mais adaptados pré avaliados por Jarma *et al.* (2006), nas condições locais colombianas.

A maior produção de massa seca de folhas encontrada nos genótipos G12 está associada ao maior IAF encontrado nesse genótipo (Tabela 4), havendo correlação positiva entre as variáveis (Tabela 5), onde o maior IAF aumenta a interceptação de radiação fotossinteticamente ativa, estimulando o crescimento da cultura e a produção de fotoassimilados (KUMAR *et al.* 2014).

A variável massa seca total sofreu influencia direta da produção de massa seca de caule, havendo uma correlação positiva entre as variáveis, porém, não significativa (Tabela 5). O genótipo G9, com uma produção de 845,20 kg.ha⁻¹ de massa seca total, foi igual aos genótipos G8 e G4 nessa variável e inferior ao G12. Esses valores são explicados pela menor AFT, IAF apresentados pelos genótipos.

Os números de ramos secundários e terciários não interferiram diretamente no IAF (PAL *et al.*, 2015). Houve baixa correlação entre a produção de massa seca de folhas e o número de ramificações, apresentando correlação negativa, porém não significativa, entre MSF e o número de ramos secundários (Tabela 5).

O genótipo G8 apresentou superioridade em relação aos demais genótipos nas variáveis relacionadas a ramificações laterais (Tabela 3). Segundo Pal *et al.* (2015), o número de ramificações está ligado ao maior tempo de desenvolvimento do sistema radicular, onde as citocininas produzidas nos ápices das raízes e radículas, são fitohormônios ligados ao estímulo de ramificações laterais, onde sistemas radiculares mais desenvolvidos produzem quantidades maiores dos referidos hormônios e os distribuem para os caules, conseqüentemente, estimulando a produção de ramos laterais (PAL *et al.*, 2015).

O genótipo G8 apresentou ciclo produtivo mais longo que os demais genótipos, com ponto de colheita aos 85 dias após o transplante, característica também observada por Francisco (2015), onde o referido genótipo nas condições de cultivo na região de

Curitiba apresentou condições de colheita com 121 dias após o transplante. Corroborando com as informações de Pal *et al.* (2015), o genótipo G8 por apresentar um ciclo diferenciado em relação demais genótipos avaliados, ciclo este mais longo, representa melhores condições para um maior desenvolvimento radicular e, conseqüentemente, maiores produções de citocininas que estimulam as ramificações laterais.

Assim como o acúmulo de massa seca de folhas sofre influências diretas do foto período (CEUNEN & GEUNS, 2013), o número de ramificações laterais também é influenciado por essa característica. Fotoperíodo em declínio, observado durante o período experimental, promovem menores acúmulos de massa seca nos diferentes genótipos (Tabela 3). Esse período de crescimento acelerado e com menor acúmulo e massa seca interfere na produção de citocininas em estévia em decorrência do menor desenvolvimento do sistema radicular (PAL *et al.*, 2015), assim, podemos dizer que o fotoperíodo interferiu diretamente no número de ramificações laterais, sejam elas secundárias ou terciárias (Tabela 3).

Quanto às variáveis relacionadas à avaliação de crescimento (Tabela 4), o genótipo G12 apresentou superioridade aos demais genótipos nas variáveis AFT, IAF e AFE, sendo igual ao genótipo G4 na variável RAF. Na variável RPF não foram observadas diferenças entre os genótipos no teste de separação de médias.

TABELA 4. AFT, IAF, RAF, AFE e RPF de quatro genótipos de estévia cultivados no Alto Vale do Itajaí. Rio do Sul, 2016.

Genótipos	AFT (cm ²)		IAF (m ² .m ⁻²)		RAF (cm ² .g ⁻¹)	AFE (cm ² .g ⁻¹)		RPF (g.g ⁻¹)
G4	719,93	b	5,75	b	42,80 a b	76,67	b	0,56 a
G8	428,01	b c	3,42	b c	23,49 b	63,41	b	0,37 a
G9	284,80	c	2,27	c	28,46 b	65,31	b	0,43 a
G12	1236,72	a	9,89	a	53,74 a	117,97	a	0,45 a

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. ¹ área foliar total (AFT), índice de área foliar (IAF), razão de área foliar (RAF), área foliar específica (AFE), Razão de peso de folha (RPF).

Tabela 5. Correlações entre as variáveis de produção de massa seca e avaliação de crescimento.

Interação entre variáveis	Coeficiente de correlação (R^2)
MSF + AFT ¹	0,85**
MSF + RAF	0,68**
MSF + AFE	0,62*
MSF + IAF	0,85**
MSF + N° ramos secundários	-0,31 ^{ns}
MSF + N° ramos terciários	0,11 ^{ns}
MST + MSF	0,70**
MSF + Reb A mg.g ⁻¹	0,91 ^{ns}

** correlação significativa ao nível de 0,01 de probabilidade, * correlação significativa ao nível de 0,05 de probabilidade, ns não significativo. ¹ Massa seca de Folhas (MSF), Número de ramos secundários (N° ramos secundários), Número de ramos terciários (N° ramos terciários), área foliar total (AFT), índice de área foliar (IAF), razão de área foliar (RAF), área foliar específica (AFE), teor de rebaudiosídeo A (Reb A mg.g⁻¹).

A estrutura das folhas pode ser um importante fator para determinar a produtividade de uma cultura (WINTER & OHLROGGE, 1973). A avaliação da área foliar é sem dúvida fator que auxilia na tomada de decisão para se eleger um genótipo mais produtivo, pois possuem a capacidade de manter uma área foliar por um maior período, possibilitando um melhor desempenho do aparato fotossintético.

Com os valores de área foliar total (AFT) é possível calcular o índice de área foliar (IAF), a razão de área foliar (RAF), área foliar específica (AFE) e razão de peso das folhas (RPF) (Tabela 4).

O genótipo G12 apresenta superioridade em relação aos demais genótipos avaliados quanto a variável AFT (Tabela 4). Comportamento análogo foi observado por Francisco (2015). Dessa forma podemos dizer que o genótipo G12 apresenta maior capacidade de manter uma área foliar por maior período, refletindo em melhores índices como IAF. O maior valor de AFT encontrado no genótipo G12 se deve, principalmente, ao maior valor de produção de massa seca de folhas, havendo uma alta correlação entre a produção de massa seca de folhas e a área foliar total (Tabela 5).

A produção de massa seca de folhas é uma variável, que segundo Ceunen & Geuns (2013), sofre influência direta da duração do fotoperíodo. Fotoperíodos mais longos promovem uma maior expansão da folha sendo altamente vantajoso para o desenvolvimento das plantas, isso se deve principalmente a maior interceptação de luz e, conseqüentemente, à maior taxa de crescimento. Com o aumento da expansão das folhas há o favorecimento do potencial fotossintético total, promovendo maior produção de

fotoassimilados, facilitando o particionamento da massa seca para outros órgãos da planta (GLOBIG *et al.*, 1997)

Os genótipos avaliados foram submetidos ao mesmo fotoperíodo. O fotoperíodo observado durante o período experimental se mostra em declínio (Tabela 1), que segundo Francisco (2015) e Ceunen & Geuns (2013) não são favoráveis ao desenvolvimento da cultura da estévia. Dessa forma, o maior ou menor acúmulo de massa seca de folhas (Tabela 5), variável que interfere nos índices de crescimento e especialmente na AFT, pode ser atribuída a diferenças genéticas entre os genótipos avaliados.

O índice de área foliar (IAF) é um importante parâmetro biométrico para avaliar respostas de plantas a diferentes condições ambientais. O IAF segundo Watson (1947) com a área total unilateral de tecido foliar por unidade de área de superfície de solo, é uma quantidade adimensional que caracteriza o dossel de uma cultura.

Os genótipos avaliados apresentaram IAF distintos entre si, variando de 2,27 a 9,89 ($\text{m}^2.\text{m}^{-2}$), valores próximos aos encontrados por Francisco (2015), que encontrou valores de 3,51 a 7,01 ($\text{m}^2.\text{m}^{-2}$). Segundo o mesmo autor, altos valores para o IAF são desejáveis, mostrando a maior tendência de produção de folhas, cobertura do solo e capacidade de competir por luz com as plantas espontâneas.

O IAF apresentou alta correlação com a variável massa seca de folhas, igual resultado foi observado por Francisco (2015). O genótipo G12 apresentando maiores produções de MSF e AFT, consequentemente apresenta maiores valores de IAF.

A RAF segundo Magalhães (1979) é a medida da dimensão do aparelho assimilador, e serve como variável para avaliações de efeitos genotípicos, climáticos e do manejo adotado no cultivo das culturas. Este parâmetro expressa a área foliar útil para a fotossíntese, ou seja, é a área foliar que é usada para a produção de 1 g de massa seca.

Observando os dados da Tabela 4, pode-se dizer que os genótipos G12 e G4 precisam de maior área foliar para sintetizar 1 g de massa seca, mostrando que esses genótipos apresentam menor eficiência fotossintética, resultados próximos foram encontrados por Francisco (2015), relatando em seu estudo que genótipos que apresentem baixa RAF podem estar associados a materiais genéticos com maior potencial para a produção de esteviosídeo e rebaudiosídeo A. Dessa forma, os genótipos

G9 e G8 apresentam maior eficiência fotossintética em relação aos demais genótipos (Tabela 4), sendo recomendados para futuros trabalhos de melhoramento vegetal.

Alterações na RAF, segundo Benincasa (2003), estão intimamente ligados à alteração em um ou nos seus dois componentes, ou seja, nos valores de AFE ou RPF.

Valores altos de RAF encontrados nos genótipos G12 e G4 podem ser explicados pela alta AFT, que influencia a AFE, e alta produção de massa seca de caule, que tem uma alta correlação com a MST (Tabela 4).

A área foliar específica (AFE) expressa a razão entre área foliar e a massa seca de folhas. Segundo Poorter & Garnier (1999) é um índice importante do ponto de vista fisiológico por representar a alocação da biomassa da folha por unidade de área, representando o componente morfológico e anatômico da RAF.

A AFE pode ser considerada a variável de maior importância para a avaliação de novos genótipos de estêvia, porque ela representa a eficiência do genótipo em sintetizar massa seca de folhas, sendo as folhas o órgão da planta de estêvia que apresenta as maiores concentrações de esteviosídeo e rebaudiosídeo A (OROZCO *et al.*, 2010; HSIEH & GOODMAN 2005).

Analisando os dados da Tabela 4 podemos observar que o genótipo G12 apresenta o maior valor de AFE em relação aos demais genótipos avaliados, demonstrando que o genótipo apresentou aumento na superfície de expansão da lâmina foliar, o que leva ao desenvolvimento de folhas mais finas e menos suculentas.

Os dados referentes à variável AFE encontrados no presente trabalho foram menores do que os dados encontrados por Francisco (2015), com valores que variaram de 10,82 a 17,37 m².kg⁻¹. Esses valores encontrados pelo referido autor podem ser explicados pelo maior período de crescimento observado nos genótipos avaliados na região da grande Curitiba. Maiores períodos de crescimentos são possibilitados por fotoperíodo crescentes, que segundo Ceunen & Geuns (2013), promovem maior acúmulo de massa seca, principalmente massa seca de folhas, acarretando dessa forma maiores índices de crescimento.

O genótipo G12 apresentou maiores valores na variável AFT e plantas com maior AFT tendem a promover o sombreamento das folhas inferiores do dossel. Em condições

de baixa radiação solar as plantas investem maior quantidade de fotoassimilados e outros nutrientes no aumento da área foliar, apresentando aumento na AFE (LAMBERS *et al.*, 2008).

A RPF, segundo Magalhães (1979) é importante quando se deseja estudar o desempenho de um cultivar. No início do desenvolvimento vegetativo, a planta é constituída por grande parte de folhas, sendo os valores dessa razão elevados, decrescendo com o tempo, pois, à medida que a planta se desenvolve, surgem outras partes que crescem à custa de material importado das folhas. Considerando que 90% dos assimilados são produzidos nas folhas, e a partir daí translocados para o resto da planta, este é um parâmetro fisiológico que expressa a fração de massa seca não exportada das folhas para o resto da planta. A taxa de exportação de fotoassimilados da folha é uma característica genética, porém sob forte influência de variáveis ambientais (BENINCASA, 2003).

Não foram observadas diferenças entre os genótipos na variável RPF (Tabela 4). Os valores encontrados para a variável analisando os diferentes genótipos foram de 0,37 a 0,56, não sendo significativamente influenciadas pelas condições de cultivo, clima e genética dos diferentes genótipos.

Produção de esteviosídeo e rebaudiosídeo A

O genótipo G12 foi o que apresentou maior teor e produtividade de esteviosídeo (Tabela 6). Na variável rebaudiosídeo A o genótipo G8 apresenta igual comportamento ao genótipo G9, sendo eles superiores aos demais genótipos avaliados (Tabela 9). O genótipo G8 é superior aos demais nas variáveis razão RebA/Est e na produtividade de rebaudiosídeo A (Reb A kg.ha⁻¹).

TABELA 6. Resultado do teste de comparação de médias para as quatro variáveis associadas ao acúmulo de glicosídeos de esteviol. Est (Esteviosídeo), Reb (Rebaudiosídeo A).

Genótipo	Teor Est (mg g ⁻¹)	Teor Reb (mg g ⁻¹)	Razão Reb.Est ⁻¹ (g.g ⁻¹)	Prod.Est (Kg.ha ⁻¹)	Prod.Reb A (Kg.ha ⁻¹)
G4	176,97 b	20,39 b	0,11 c	133,66 b	15,33 c
G8	145,93 c	64,77 a	0,44 a	79,25 c	35,14 a
G9	128,47 c	49,05 a	0,38 b	44,72 d	17,12 c
G12	200,07 a	26,81 b	0,13 c	167,28 a	22,41 b

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Teor de esteviosídeo (Teor Est mg g⁻¹), teor de rebaudiosídeo A (Teor Reb mg g⁻¹), razão entre rebaudiosídeo A: esteviosídeo (Razão Reb.Est⁻¹ g.g⁻¹), produtividade de esteviosídeo por hectare (Prod. Est kg.ha⁻¹), produtividade de rebaudiosídeo A por hectare (Prod. Reb A kg.ha⁻¹).

Os resultados dos teores de esteviosídeo (esteviosídeo mg.g⁻¹) e rebaudiosídeo A (rebaudiosídeo A mg.g⁻¹) para os quatro genótipos avaliados (Tabela 6), evidenciaram que as diferenças entre os genótipos se devem a fatores genéticos (YADAV, *et al.*, 2011). Segundo Vasilakoglou *et al.* (2015), Tavarini & Angelini (2013), fatores como idade das plantas, tempo de colheita, desempenham papel importante no acúmulo de glicosídeos de esteviol, bem como, a razão entre esteviosídeo/rebaudiosídeo A. Vasilakoglou *et al.* (2015), apresentaram em seu estudo que lavouras de estévia de primeiro ciclo tendem a ter menor acúmulo de glicosídeos de esteviol no tecido foliar. Isso se deve, principalmente, aos problemas relacionados ao estabelecimento da cultura que favorecem o menor tempo para o acúmulo de biomassa, ou seja, ocorre concorrência direta por nutrientes entre metabolismo primário em relação ao secundário.

Os resultados observados para os teores de esteviosídeo no presente trabalho (Tabela 6) variaram entre 128,47 mg.g⁻¹ (12,8%) para o genótipo G9 a 200,07 mg.g⁻¹ (20%) para o genótipo G12, sendo esses resultados coerentes com os valores obtidos por Francisco (2015). O referido autor obteve 12% de esteviosídeo no tecido foliar para o genótipo G9 e 14,2% para o genótipo G12, sendo os resultados obtidos na variável teor de esteviosídeo no genótipo G12 superiores aos encontrados por Francisco (2015).

O teor de esteviosídeo e a produtividade de esteviosídeo apresentam alta correlação com a variável massa seca de folhas (Tabela 7). Segundo Francisco (2015) genótipos que apresentam uma alta produção de MSF apresenta alta produção de esteviosídeo. Segundo o autor, essa característica é interessante para futuros trabalhos de melhoramento genético da cultura.

A variável massa seca de folhas sofre influência do fotoperíodo (CEUNEN & GEUNS, 2013). Em condições de fotoperíodo crescente, a estévia apresenta maior acúmulo de massa seca de folhas (CEUNEN & GEUNS, 2013), característica esta observada no trabalho de Francisco (2015). No presente trabalho todos os genótipos foram expostos ao mesmo fotoperíodo decrescente, indicando que as diferenças observadas na variável acúmulo de massa seca de folhas, e consequentemente no teor e produtividade de esteviosídeo, estão associadas a diferenças genéticas entre os genótipos.

Na variável teor de rebaudiosídeo A se observa que os genótipos G8 e G9 são iguais e foram superiores aos demais genótipos avaliados (Tabela 6) variando de 20,39 mg.g⁻¹ (2,03%) para o genótipo G4 a 64,77 mg.g⁻¹ (6,47%) para o genótipo G8. Esses valores observados foram menores que os observados por Francisco (2015) em seu estudo.

As diferenças observadas entre o presente trabalho e o trabalho de Francisco (2015), quanto a variável teor de rebaudiosídeo A, podem ser explicadas pela diminuição no acúmulo de rebaudiosídeo A com a diminuição do ciclo de desenvolvimento que os genótipos de estévia foram submetidos. A diminuição do ciclo de desenvolvimento, como já relatado anteriormente, se deve a influência da diminuição do fotoperíodo durante o período experimental, influência esta relatada por Ceunen & Geuns (2013), e também observada por Francisco (2015). O referido autor relata que os genótipos avaliados apresentaram uma redução de 27,9% no acúmulo de esteviosídeo e 36,6% no acúmulo de rebaudiosídeo A em condições de fotoperíodo em declínio. Francisco (2015) também relata que o genótipo G8 apresenta leve tendência a melhorar a razão Reb.Est⁻¹ em condições de foto período decrescente.

A análise de correlação entre caracteres morfofisiológicos e os componentes de produção de esteviosídeo e rebaudiosídeo A de acessos de estévia demonstra que as variáveis MSF, AFT, IAF, AFE e RAF exibiram correlação alta com teores esteviosídeo e produção de esteviosídeo por hectare, enquanto o teor de rebaudiosídeo A, razão entre Reb.Est⁻¹ e produtividade rebaudiosídeo A apresentaram correlação negativa com as variáveis MSF, AFT, IAF, AFE e RAF (Tabela 7).

Tabela 7. Correlações entre as variáveis de crescimento com a produção e teores de esteviosídeo e rebaudiosídeo A.

Correlação entre variáveis	Coeficiente de correlação (R^2)
MSF + Est mg.g ⁻¹	0,98**
MSF + Reb A mg.g ⁻¹	-0,73 ^{ns}
MSF + EST kg.ha ⁻¹	0,98**
MSF + Reb A kg.ha ⁻¹	0,00 ^{ns}
AFT + Est mg.g ⁻¹	0,97*
AFT + Reb mg.g ⁻¹	-0,70 ^{ns}
AFT + Razão Reb.Est ⁻¹	-0,80 ^{ns}
AFT + Est kg.ha ⁻¹	0,90**
AFT + Reb A kg.ha ⁻¹	-0,08 ^{ns}
IAF + Est mg.g ⁻¹	0,97*
IAF + Est mg.g ⁻¹	-0,70 ^{ns}
IAF + Est kg.ha ⁻¹	0,90**
IAF + Reb A kg.ha ⁻¹	-0,08 ^{ns}
IAF + Razão Reb.Est ⁻¹	-0,80 ^{ns}
AFE + Est mg.g ⁻¹	0,88 ^{ns}
AFE + Reb A mg.g ⁻¹	-0,63 ^{ns}
AFE + Razão Reb.Est ⁻¹	-0,71 ^{ns}
AFE + Est kg.ha ⁻¹	0,71**
AFE + Reb A kg.ha ⁻¹	0,15 ^{ns}
RAF + Est mg.g ⁻¹	0,93 ^{ns}
RAF + Reb A mg.g ⁻¹	-0,88 ^{ns}
RAF + Razão Reb.Est ⁻¹	-0,93 ^{ns}
RAF + Est kg.ha ⁻¹	0,78**
RAF + Reb A kg.ha ⁻¹	-0,38 ^{ns}

** correlação significativa ao nível de 0,01 de probabilidade, * correlação significativa ao nível de 0,05 de probabilidade, ns não significativo. Massa seca de Folhas (MSF), Número de ramos secundários (Nº ramos sec), Número de ramos terciários (Nº ramos terc), área foliar total (AFT), índice de área foliar (IAF), razão de área foliar (RAF), área foliar específica (AFE), teor de esteviosídeo (Est mg g⁻¹), teor de rebaudiosídeo A (Reb A mg.g⁻¹), razão entre rebaudiosídeo A : esteviosídeo (Razão Reb.Est⁻¹), produtividade de esteviosídeo (Est Kg.ha⁻¹), produtividade de rebaudiosídeo A (Reb A Kg.ha⁻¹).

A baixa produtividade de rebaudiosídeo A apresenta uma correlação negativa com as variáveis MSF e os índices AFT, IAF, AFE e RAF (Tabela 7). Essa correlação negativa pode explicar a menor produção de rebaudiosídeo A em genótipos com maiores índices de crescimento. Segundo Bondarev *et al.* (2010) folhas menores de estêvia apresentam maior adensamento de tricomas glandulares, e consequentemente, apresentando maior teor de rebaudiosídeo A.

Além dos fatores relacionados à produção de biomassa, ciclo de crescimento influenciado pelo fotoperíodo, o fator fertilidade do solo interfere diretamente no acúmulo de glicosídeos de esteviol no tecido foliar de estévia. Tavarini *et al.* (2015), apresentaram em seu trabalho que o aumento na adubação nitrogenada, até dosagens de 150 kg.ha⁻¹, e suplementadas por adubações com micronutrientes, obtiveram maiores acúmulos de rebaudiosídeo A e melhor razão Reb.Est⁻¹, sendo esses valores superiores aos encontrados no presente trabalho.

A razão Reb.Est⁻¹ é um fator determinante quanto à avaliação de novos genótipos de estévia. De acordo com Mota *et al.* (2011), a razão Reb.Est⁻¹ ideal para a indústria é 1. Atualmente, encontramos em grandes países produtores de estévia cultivares que apresentam a razão entre reb/est superiores a 1. O Japão detém uma cultivar sob patente 61-202667, que possui razão entre reb/est de 2,56 (YADAV *et al.*, 2011). No estado do Paraná encontramos uma cultivar, UEM – 320, que apresenta razão Reb.Est⁻¹ entre 1,05 a 1,15 (DACOME *et al.*, 2005).

Nenhum genótipo avaliado apresentou a razão desejada entre Reb.Est⁻¹, embora, o genótipo G8 apresentou melhor razão quando comparado aos demais (Tabela 6). As razões observadas nos genótipos avaliados foram menores do que os valores observados por Francisco (2015), Tavarini *et al.* (2015) e Mandal *et al.* (2013, 2015).

Na síntese do rebaudiosídeo A, o substrato utilizado pela enzima UGT76G1 é o esteviosídeo. Essa enzima é responsável pelo acréscimo de mais uma molécula de glicose no esteviosídeo (BRANDLE *et al.*, 2007). Os genótipos apresentaram teores de esteviosídeo próximos aos apresentados por Francisco (2015), assim, podemos constatar que a baixa razão Reb.Est⁻¹ está diretamente relacionada à baixa produção de rebaudiosídeo A, influenciada pelo ciclo reduzido da cultura.

A produtividade de esteviosídeo foi maior no genótipo G12. O maior acúmulo de glicosídeos de esteviol é observado no tecido foliar (GARDANA *et al.*, 2010). Dessa forma, os genótipos que apresentam maior produtividade de massa foliar e maiores concentrações de metabólitos secundários, características genéticas (YADAV *et al.*, 2011) associadas a tratos culturais (TAVARINI *et al.*, 2015; VASILAKOGLU *et al.*, 2015), tendem, conseqüentemente, a apresentar melhor desempenho quanto a variável em questão.

Há forte correlação entre a produção de massa seca de folhas e índices como AFT, IAF, AFE e RAF (Tabela 7) com a produtividade de esteviosídeo. Como já discutido anteriormente, Francisco (2015) aponta que genótipos com maiores índices de crescimento e acúmulo de massa seca de folhas apresentam maior produtividade de esteviosídeo.

Na variável produtividade de rebaudiosídeo A não observamos correlações positivas com os índices de crescimento e produção de massa seca de folhas, onde o genótipo G8 apresentou superioridade em relação aos demais. A maior produtividade do genótipo G8 está diretamente relacionada com o maior teor de rebaudiosídeo A.

Esse fator deve estar relacionado à capacidade de conversão de esteviosídeo em rebaudiosídeo, característica essa influenciada por condições genéticas dos genótipos avaliados, e também, por condições relacionadas ao ciclo da cultura influenciado pelo fotoperíodo durante o período experimental.

3.4 CONCLUSÕES

O genótipo G8 apresenta maior teor de rebaudiosídeo A, maior produtividade de rebaudiosídeo A e melhor razão Reb.Est⁻¹ nas condições produtivas com fotoperíodo em declínio no Alto Vale do Itajaí (SC) ;

O genótipo G12 apresenta melhores taxas de crescimento, índices morfofisiológicos, teor de esteviosídeo e produtividade de esteviosídeo nas condições produtivas com fotoperíodo em declínio no Alto Vale do Itajaí;

Nenhum genótipo avaliado nas condições produtivas com fotoperíodo em declínio no Alto Vale do Itajaí (SC) apresenta razão Reb.Est⁻¹ adequadas para a indústria, ou seja, próximas a 1.

REFERÊNCIAS

- ANTON, SD. *et al.* Effects of stevia, aspartame, and sucrose on food intake, satiety, and postprandial glucose and insulin levels. **Appetite**, v.55, p.37–43, 2010.
- BENINCASA, M. M. P. **Análise de crescimento de plantas**: noções básicas. Jaboticabal: FUNEP, 2003. 42 p.
- BONDAREV, N. I. *et al.* Morphology and ultrastructure of trichomes of intact and in vitro plants of *Stevia rebaudiana* Bertoni with reference to biosynthesis and accumulation of steviol glycosides. **Moscow University Biological Sciences Bulletin**. v. 65, n. 1, p. 12-16. 2010.
- BRANDLE, J.; TELMER, P.G. Steviol glycoside biosynthesis. **Phytochemistry**, v.68, p.1855-1863, 2007.
- CARVALHO, M.A.M DE; ZAIDAN, L.B.P. Obtenção de plantas de *Stevia rebaudiana* através de estacas. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.30, n.2, p.201-206, 1995.
- CEUNEN, S.; GEUNS, J.M.C. *Stevia rebaudiana* grown under different photoperiods. **Phytochemistry**. v.89, p. 32 -38, 2013.
- CUNHA, J.L.X.L. *et al.* Comparação de métodos de área foliar em *Chrysobalanus icaco* L. **Agropecuária científica no semi-árido**, v.06, n.03, p.22-27, 2010.
- DACOME, A. S. *et al.* Sweet diterpenic glycosides balance of a new cultivar of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni: Isolation and quantitative distribution by chromatographic, spectroscopic, and electrophoretic methods. *Process Biochem.* v. 40, n. 11, p. 3587–3594, 2005.
- EMBRAPA. **Sistema de produção 5: Estévia**. 1ª.ed. Maringá, PR, Brasil, Steviafarma Industrial S/A, 2004. 55p.
- EMBRAPA. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. 2ª.ed. Rio de Janeiro, Brasil, 2006. 306p.
- ESPITA, C.M. *et al.* Rendimiento de *Stevia rebaudiana* Bert. bajo tres arreglos poblacionales en el Sinú Medio. **Revista U.D.C.A actualidad e divulgación científica**, v.12, n.1, p.151-161, 2009.
- FRANCISCO, F. **Acúmulo de biomassa, produção de esteviosídeo e rebaudiosídeo A e tolerância à geada e ao acamamento de acessos de *Stevia rebaudiana* bert.** 2015. 72p. Dissertação (Mestrado – Área de Concentração em Metabolismo Secundário)

Programa de pós-graduação em Agronomia Produção vegetal da Universidade Federal do Paraná, PR, Brasil.

GARDANA, C. *et al.* Evaluation of steviol and its glycosides in *Stevia rebaudiana* leaves and commercial sweetener by ultra-high performance liquid chromatography– mass spectrometry. **Journal of Chromatogr A**, v.1217, p.1463–1470, 2010.

GLOBIG, S. *et al.* Continuous light effects on photosynthesis and carbon metabolism in tomato. **Acta Horticulturae**, n.418, p.141-151, 1997.

HSIEH, M.; GOODMAN, H. The Arabidopsis IspH homolog is involved in the plastid nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. **Plant Physiol.** v.138, n. 2, p.641-653, 2005.

INSTITUTO FEDERAL CATARINENSE – Campus Rio do Sul. **Dados climáticos**, 2014.

JARMA, A. *et al.* Fisiología de estevia (*Stevia rebaudiana*) en función de la radiación en el Caribe colombiano. II. Análisis de crecimiento. **Agronomia Colombiana**, v.24, n.1, p.38-47, 2006.

KOLB, N. *et al.* Analysis of sweet diterpeno glycosides from *Stevia rebaudiana*: improved HPLC method. **Journal of agriculture, food and chemistry**, v.49, p. 4538 – 4541. 2001.

KUMAR, R.; SHARMA, S.; SOOD, S. Yield components, light interception and marker compound accumulation of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) affected by planting material and plant density under western Himalayan conditions. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 60, n.12, p 1731–1745, 2014. DOI: 10.1080/03650340.2014.909029

LAMBERS, H.; CHAPIN, F. S.; PONS, T. L. **Plant physiological ecology**. 2.ed. New York: Springer, 2008. 610p.

LEMUS-MONDACA, R. *et al.* *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. **Food Chemistry**, v.132, p.1121-1132, 2012.

MAGALHÃES, A.C.N. Análise quantitativa do crescimento. In: FERRI, M.G. **Fisiologia Vegetal**. EPU/EDUSP, São Paulo. 1979. v. 1, p. 331-350.

MANDAL, S. *et al.* Arbuscular mycorrhiza enhances the production of stevioside and rebaudiosídeo A in *Stevia rebaudiana* via nutritional and non-nutritional mechanisms. **Applied soil ecology**, v.72, p.187-194, 2013.

MANDAL, S. *et al.* Enhanced production of steviol glycosides in mycorrhizal plants: A concerted effect of arbuscular mycorrhizal symbiosis on transcription of biosynthetic genes. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.89, p.100-106. 2015.

MOTA, TR. *et al.* Seleção de clones de elite de *Stevia rebaudiana*(Bert.) Bertoni com ênfase no teor do rebaudiosídeo A e a atividade antioxidante. Anais eletrônicos. VII EPCC – ENCONTRO INTERNACIONAL DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA CESUMAR. CESUMAR – Centro Universitário de Maringá, Editora CESUMAR, Maringá, Paraná, Brasil. Disponível em http://www.cesumar.br/prppge/pesquisa/epcc2011/anais/thatiane_rodrigues_MOTA_3.pdf. Acesso em: 20 jun. 2015.

OROZCO, A.J. *et al.* Síntesis de esteviosidos en estévia (*Stevia rebaudiana* Bert.). **Acta Biologica Colombiana**, v.15, n.1, p.289-294, 2010.

PAL, P. K.; MAHAJAN, M.; PRASAD, R.; PATHANIA, V.; SINGH, N.; AHUJA, P.S. Harvesting regimes to optimize yield and quality in annual and perennial *Stevia rebaudiana* under sub-temperate conditions. **Industrial Crops and Products**, v. 65, p. 556–564, 2015. DOI: 10.1016/j.indcrop.2014.09.060.

POORTER, H; GARNIER, E. Ecological significance of inherent variation in relative growth rate and its components. In: Pugnaire, F.I.; VALLADARES, F. (Eds). **Handbook of functional plant**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1999. p.81–120.

RENEWICK, A.G. The use of a sweetener substitution method to predict dietary exposures for the intense sweetener rebaudioside A. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p.61-69, 2008.

RODRIGUES, T.J.D., LEITE, I.C., SANTOS, D.M.M. 1998. **Roteiro Para Aulas Práticas De Fisiologia Vegetal**. Jaboticabal, FUNEP, 79 p. ilustr.

SERFATY, M.; IBDAH, M.; FISCHER, R.; CHAIMOVITSH, D.; SARANGA, Y.; DUDAI, N. Dynamics of yield components and stevioside production in *Stevia rebaudiana* grown under different planting times, plant stands and Harvesting regimes. **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 731-736, 2013. DOI: 10.1016/j.indcrop.2013.08.063.

SILVA, F de A.S; AZEVEDO, C.A.V de. Principal components analysis in the software Assistat-Statistical Attendance. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7, 2009, RENO-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIÊNCIA DO SOLO-SBCS. COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO - RS/SC. SBCS. 2016. **Manual de calagem e adubação para os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**. 11ª ed. Porto Alegre: Núcleo Regional Sul - Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 376p.

TAVARINI, S.; ANGELINI L.G. *Stevia rebaudiana* Bertoni as a source of bioactive compounds: the effect of harvest time, experimental site and crop age on steviol glycoside content and antioxidant properties. **Journal of the Science of Food and Agriculture** , v.93, p.2121–2129, 2013.

TAVARINI, S. *et al.* Effect of nitrogen fertilization and harvest time on steviol glycosides, flavonoid composition and antioxidant properties in *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.63, n. 31, p.7041-7050, 2015.

VASILAKOGLU, I. *et al.* Productivity of two stevia varieties under reduced irrigation and fertilization inputs. **Archives of Agronomy and Soil Science**, DOI: 10.1080/03650340.2015.1060554, 2015.

WATSON, D.J. Comparative physiological studies on growth of field crops. I. Variation in net assimilation rate and leaf area between species and varieties, and within and between years. **Annals of Botany**, v.11, n.1, p. 41-76, 1947.

WINTER, S.R., OHLROGGE, A.J. Leaf angle, leaf area, and corn (*Zea mays* L.) yield. **Agronomy Journal**, v.65, n.3, p.395-97, 1973.

YADAV, A.K. *et al.* A review on the improvement of stevia [*Stevia rebaudiana* Bertoni]. **Canadian Journal of Plant Science**, v.91, p.1-27, 2011.

4 CAPÍTULO III – EFEITOS DA ADUBAÇÃO NITROGENADA SOBRE O DESENVOLVIMENTO E PRODUÇÃO DE GLICOSÍDEOS DITERPÊNICOS NA CULTURA DA ESTÉVIA (*Stevia rebaudiana* Bertoni) NAS CONDIÇÕES DE CAMPO NA REGIÃO DO ALTO VALE DO ITAJAÍ-SC-BRASIL

RESUMO: O efeito de diferentes doses de nitrogênio sobre produção de biomassa, teor e produtividade de esteviosídeo e rebaudiosídeo A na cultura da estévia foram avaliados em experimento conduzido a campo no Instituto Federal Catarinense, Rio do Sul (SC), Brasil, em condições de fotoperíodo decrescente. Utilizou-se o delineamento experimental blocos casualizados, com quatro blocos e cinco tratamentos (0, 65, 135, 200 e 270 kgN.ha⁻¹). Foram avaliadas as variáveis relacionadas à produção de biomassa (MS Total, MS Caule, MS Folhas, N° de Ramos Secundário, N° Ramos Terciário e Comprimento do Maior Ramo), variáveis relacionadas aos índices de crescimento (AFT, IAF, AFE, RAF e RPF), e também, variáveis relacionadas ao teor e produtividade de esteviosídeo e rebaudiosídeo A. As diferentes doses de adubação nitrogenada não afetaram as variáveis relacionadas ao acúmulo de massa seca no genótipo G8 cultivado em condições de fotoperíodo em declínio nas condições de campo do Alto Vale do Itajaí (SC). Os níveis de adubação nitrogenada não afetaram os teores de esteviosídeo e rebaudiosídeo A, a produtividade de esteviosídeo e rebaudiosídeo A e a razão de rebaudiosídeo A/esteviosídeo no G8 cultivado em condições de fotoperíodo decrescente a campo na região do Alto Vale do Itajaí (SC).

Palavras-chave: *Stevia rebaudiana* Bertoni, biomassa, esteviosídeo, rebaudiosídeo A.

EFFECTS OF NITROGEN FERTILIZATION ON THE DEVELOPMENT AND PRODUCTION OF DITERPENIC GLYCOSIDES IN STEVIA CULTURE (*Stevia rebaudiana* Bertoni) IN FIELD CONDITIONS IN THE ALTO VALE DO ITAJAÍ REGION-SC-BRAZIL

ABSTRACT: The effect of different doses of nitrogen on biomass production, content and productivity of stevioside and rebaudioside A in the stevia culture were evaluated. The experiment was carried out at Catarinense Federal Institute, in Rio do Sul (SC), Brazil, under conditions of decreasing photoperiod. A randomized complete block design with four blocks and five treatments (0, 65, 135, 200 and 270 kgN.ha⁻¹) were used. The variables related to the biomass production (Total dry mass, dry mass of leaves, dry mass of stems, Secondary Branches, Tertiary Branches and Major Branch) were evaluated, variables related to growth rates (Total leaf area, leaf area index, specific leaf area, leaf area ratio, leaf weight ratio), and also variables related to the content and productivity of stevioside and rebaudioside A. The different doses of nitrogen fertilization did not affect the variables related to the accumulation of dry mass in G8 genotype cultivated under conditions of declining photoperiod in the field conditions of Alto Vale do Itajaí (SC). Nitrogen fertilization levels did not affect stevioside and rebaudioside A, stevioside and rebaudioside A, and Reb.Est⁻¹ ratio in G8 cultivated under field conditions in the Alto Vale do Itajaí (SC) region.

Key words: *Stevia rebaudiana* Bertoni, biomass, stevioside, rebaudioside A.

4.1 INTRODUÇÃO

O cultivo da estévia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) no Brasil é bastante limitado e precisa haver mais pesquisas quanto às práticas de cultivo e adubação para poder atender as necessidades do mercado interno e externo, e competir dessa forma com outros centros produtores. A estévia, planta pertencente à família das Asteraceae, sintetiza em suas rotas metabólicas secundárias, dois glicosídeos de esteviol, esteviosídeo e rebaudiosídeo A, majoritários de grande valor comercial e nutracêutico. Esses valores se dão principalmente pelo alto valor edulcorante com índice glicêmico nulo (YADAV *et al.*, 2012; ESPITA *et al.*, 2009).

O maior produtor mundial da cultura é a China, detendo 80% do volume produzido. Estima-se que em 2015 os valores gerados pela venda dos metabólitos secundários da cultura chegaram a 11 bilhões de Dólares (ANKIT, 2014).

O nitrogênio desempenha importante função no metabolismo e nutrição das culturas, e a sua deficiência causa desordens na síntese de várias organelas e enzimas responsáveis pelo crescimento e acúmulo de metabólitos secundários (GOBBO-NETO *et al.*, 2007). O nitrogênio é um elemento chave na regulação da fotossíntese por ser de grande importância na constituição da enzima ribulose-1, 5 – bifosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco) e outras enzimas envolvidas no processo fotossintético (TAVARINI *et al.*, 2015). O excesso desse nutriente causa problemas no acúmulo de óleo em girassol e problemas no acúmulo de biomassa nas plantas devido à diluição do potássio (CANTARELLA, 2007). O aumento da incidência de pragas e doenças também é observado quando o elemento nitrogênio é ofertado às culturas em dosagens excessivas. A espessura da folha, característica importante para a determinação da capacidade fotossintética, é afetada diretamente pelo excesso ou falta de nitrogênio (TAVARINI *et al.*, 2015).

Poucos são os trabalhos que correlacionam o efeito da adubação nitrogenada (TAVARINI *et al.*, 2015; ALADAKATTI *et al.*, 2012; UTUMI *et al.*, 1999) e o acúmulo de biomassa e metabólitos secundários em estévia. Assim, o estudo de diferentes doses de adubação nitrogenada é importante ferramenta para o cultivo eficiente de *Stevia rebaudiana* Bert. na região do Alto Vale do Itajaí.

Objetivou-se, neste trabalho, avaliar a resposta da cultura da estêvia a campo submetido a diferentes doses de nitrogênio em cobertura, nas condições de solo e clima do Alto Vale do Itajaí.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido em área experimental pertencente ao Instituto Federal Catarinense, Campus Rio do Sul, SC, Brasil, no ano de 2015/2016. As coordenadas geográficas desse local são 27°21'45'', latitude sul, 49°64'35'', longitude oeste. A altitude do local do estudo é de 693,7 m. O clima local, segundo a classificação de Köppen, é descrito como Cfa, ou seja, clima mesotérmico úmido com verões quentes. Os dados climáticos da ocasião do experimento estão dispostos na Tabela 8.

Tabela 8. Precipitação pluviométrica, temperatura, umidade e fotoperíodo durante o experimento. Rio do Sul 2015/2016

Dados Climáticas	Dezembro	Janeiro	Fevereiro	Março
Precipitação (mm)	152	81,0	184,2	268,2
Temperatura Máxima (°C)	32,7	33,4	35,6	29,9
Temperatura Mínima (°C)	14,4	14,4	15,1	11,7
Temperatura Média (°C)	21,7	21,9	22,6	20,3
Umidade relativa do Ar (%)	89	91	93	94
Fotoperíodo (h)	13,72	13,68	13,24	12,57

Fonte : IFC – Rio do Sul, estação meteorológica, 2106.

O solo da área experimental utilizada para a implantação do experimento recebe classificação como Cambissolo Háplico Alumínico típico (EMBRAPA, 2006). Os dados da análise do solo se encontram na Tabela 9.

O solo foi corrigido de acordo com o Manual de Adubação e Calagem para os Estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul (SBCS, 2016). A adubação foi realizada com, 8,3 t.ha⁻¹ de calcário (PRNT 100%), 130 kg.ha⁻¹ de P₂O₅ e 40 kg.ha⁻¹ de K₂O, fornecidos respectivamente por calcário Filler, superfosfato simples e cloreto de potássio, sendo o calcário aplicado com dois meses de antecedência e os demais corretivos aplicados no momento da preparação dos canteiros.

TABELA 9. Características químicas do solo utilizado para o desenvolvimento do experimento.

pH	Al ⁺³	H ⁺ +Al ⁺³	Ca ⁺²	Mg ⁺²	CTC	K ⁺	P	M.O	V
SMPcmolc dm ⁻³mg dm ⁻³			%	%
5,2	2,3	10,9	2,4	1,4	14,88	72,0	1,4	2,3	26,78

No estudo foi utilizado um genótipo G8 de estêvia (*Stevia rebaudiana* Bert.), fornecido pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Recursos Genéticos (EMBRAPA – CENARGEN), foi utilizado por apresentar maior produção de rebaudiosídeo A em comparação aos outros avaliados (FRANCISCO, 2015).

As mudas foram obtidas de ramos de plantas matrizes encontradas na Fazenda Canguiri, pertencente à Universidade Federal do Paraná, localizada no município de Pinhais, PR, Brasil. A metodologia utilizada foi descrita por Espita *et al.* (2009), e Carvalho & Zaidan (1995), com a utilização de indutores de enraizamento, AIB, na concentração de 2000 mgL⁻¹. As mudas foram produzidas em tubetes nas dependências do Instituto Federal Catarinense campus Rio do Sul, SC, utilizando-se o substrato comercial Macrofértil®. No momento do transplante as mudas foram submetidas à quebra de dominância apical, através do desponte, segundo recomendação da Embrapa (2004).

As mudas foram transplantadas no dia 15 de dezembro de 2015 em canteiros previamente preparados com encanteirador (Figura 6). O espaçamento utilizado foi de 0,25 X 0,50 cm gerando uma população correspondente de 80.000 plantas ha⁻¹.



Figura 6 - Área experimental referente à avaliação de doses de adubação nitrogenada a campo. Fonte: Debarba, 2015.

Durante todo o período de condução do experimento foram realizadas capinas com objetivo de controle de plantas espontâneas. Não foram necessários tratamentos fitossanitários para controle de pragas e doenças. A área experimental foi irrigada nos primeiros quinze dias após o transplante das mudas.

O delineamento utilizado foi o de blocos casualizados com cinco tratamentos e quatro repetições. Os tratamentos foram cinco doses de nitrogênio fornecidas por ureia (45% N): 0% (0 kgN.ha⁻¹; 0 gN/planta), 75% (65 kgN.ha⁻¹; 0,85 gN/planta), 150% (135 kgN.ha⁻¹; 1,65 gN/planta), 225% (200 kgN.ha⁻¹; 2,53 gN/planta) e 300% (270 kgN.ha⁻¹; 3,38 gN/planta). Essas doses foram definidas de acordo com a recomendação de adubação nitrogenada para o solo a área experimental (90 kg.ha⁻¹) (SBCS, 2016). A aplicação da ureia foi parcelada em três vezes em doses iguais, no transplante das mudas, trinta dias e quarenta e cinco dias após o transplantio. O parcelamento da adubação nitrogenada em três vezes difere da recomendação da SBCS (2016), isso se fez necessário para avaliar com maior exatidão os efeitos das doses de adubação utilizadas.

Cada parcela foi composta por 21 plantas, três linhas de 7 plantas, e a área útil, por cinco plantas centrais. O ponto de colheita, que ocorre com 5% de florescimento

(EMBRAPA, 2004), se deu em períodos distintos para cada tratamento, em média 86 dias após o transplante. Foram avaliadas as seguintes características: massa seca de caule, massa seca de ramo, massa seca total, comprimento do ramo principal, número de ramos secundários, número de ramos terciários, área foliar (AF), índice de área foliar (IAF), área foliar específica (AFE), razão de área foliar (RAF), produção de esteviosídeo e rebaudiosídeo A por planta e ha, teores de esteviosídeo e de rebaudiosídeo A e a razão esteviosídeo/rebaudiosídeo A.

As plantas da parcela útil foram cortadas a 5 cm do solo (EMBRAPA, 2004), as mesmas foram levadas ao laboratório de botânica do Instituto Federal Catarinense campus Rio do Sul, SC, com o objetivo de separar as folhas dos ramos. A massa seca de folhas e ramos foi determinada em balança digital, após secagem das plantas a 50 °C até atingirem peso constante (ESPITA *et al.*, 2009). A determinação da altura do maior ramo foi realizada com fita métrica, enquanto a determinação de número de ramos secundários e terciários foi realizada com a simples contagem manual.

As variáveis Área Foliar (AF), Índice de Área Foliar (IAF), Área Foliar Específica (AFE), Razão de Área Foliar (RAF) e Razão de peso das Folhas (RPF) foram obtidos por meio das metodologias descritas por Jarma *et al.* (2006), e Cunha *et al.* (2010) e serão descritas a seguir:

Área foliar (AF):

A área foliar foi obtida pela metodologia de massa seca de discos foliares descrita por Cunha *et al.* (2010). Com um perfurador de área conhecida (10 mm de diâmetro), através de punções, tomou-se 50 amostras de discos foliares e relacionou-se a massa seca da área conhecida do disco com a massa seca de folhas, unidade m².

Índice de área foliar (IAF):

O índice de área foliar (IAF) foi obtido pela razão entre a área foliar do dossel e a unidade de superfície projetada no solo (m²/m²).

$$IAF = AF_{total}/AS$$

Área foliar específica (AFE):

Obtida pela razão entre a área foliar total da planta e a massa seca total de folhas da planta ($\text{cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$).

$$\text{AFE} = \text{AF}_T / \text{MS}_{\text{folhas}}$$

Razão de área foliar (RAF):

Obtida pela razão entre a área foliar total e a massa seca total da planta ($\text{cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$).

$$\text{RAF} = \text{AF}_T / \text{MS}_T$$

Razão de peso das folhas (RPF)

Calculada pela divisão da massa seca de folhas e a massa seca total da planta ($\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)

$$\text{RPF} = \text{MS}_F / \text{MS}_T$$

Para a determinação da produção de esteviosídeo e rebaudiosídeo A foram coletadas amostras de 1g de tecidos foliares de cada tratamento. A metodologia de extração e quantificação adotada foi a descrita por Kolb *et al.* (2001), com pequenas modificações. As amostras de tecido foliar seco foram acondicionadas em frascos Erlenmeyer de 250 mL com 100 mL de EtOH 70%. A solução foi aquecida a 70 °C e agitada por 30 minutos. Após o resfriamento, uma alíquota de 10 mL foi filtrada (papel filtro, quantitativo, e filtro de seringa, nylon 0,22 μm). Utilizou-se 0,3 mL da amostra extraída das folhas de cada tratamento acrescentando-se 0,7 mL de acetonitrila grau HPLC. Dessa diluição injetou-se 20 μL para posterior análise em cromatógrafo líquido de Alta eficiência, (Shimadzu CBM-10A) contendo coluna Phenomenex Luna® 5 μm NH_2 100 Å, 250 x 4.6 mm. A eluição foi a temperatura ambiente, no modo isocrática utilizando solvente acetonitrila/água destilada (80:20, v/v), fluxo de 2 mL min^{-1} . A detecção foi realizada por UV em 210 nm com sensibilidade ajustada para 0.04 AUFS. As leituras foram feitas em triplicata. A quantificação de cada metabólito foi obtida através da conversão da área da curva correspondente ao tempo de retenção utilizando uma curva de calibração previamente estabelecida. A solução padrão para obtenção da curva de calibração foi composta por 1,0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ de esteviosídeo e rebaudiosídeo A em MeOH (KOLB *et al.*, 2001). A conversão é expressa em mg g^{-1} o que corresponde a porcentagem.

Os resultados das variáveis avaliadas foram submetidos à análise de variância utilizando o programa estatístico Assistat 7.7 beta (SILVA & AZEVEDO, 2009). Inicialmente as variâncias dos tratamentos foram avaliadas quanto a sua homogeneidade pelo teste de Bartlett. As variáveis cujas variâncias foram homogêneas tiveram os efeitos dos tratamentos testados por meio do teste de F, em uma análise de variância e se significativa as médias foram comparadas pelo teste de Tukey em a 5% de probabilidade.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Desenvolvimento de plantas

As médias das variáveis produções de massa seca total, massa seca de caules, massa seca de folhas, número de ramos secundários e terciários e comprimento do maior ramo em função das doses de nitrogênio estão apresentados na Tabela 10. As variáveis apresentadas não foram alteradas no teste de separação de médias (Tabela 10).

Tabela 10. Variáveis associadas à produção de massa seca de estévia submetida a diferentes doses de nitrogênio.

Nitrogênio (Kg.ha ⁻¹)	MS Total (Kg.ha ⁻¹)	MS Caule (Kg.ha ⁻¹)	MS Folhas (Kg.ha ⁻¹)	Nº ramos sec	Nº ramos terc	Comp. Maior ramo
0	968,80 ^{ns}	667,70 ^{ns}	301,20 ^{ns}	3,12 ^{ns}	31,37 ^{ns}	52,60 ^{ns}
68	985,60	671,20	314,40	3,30	31,80	53,60
135	926,40	621,60	304,80	3,32	31,65	53,07
200	911,00	617,60	293,40	3,27	31,05	53,00
270	876,00	589,60	286,40	3,00	30,80	50,60

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. ¹ Massa seca total (MS Total), Massa seca de caule (MS Caule), Massa seca de Folhas (MS Folhas), Número de ramos secundários (Nº ramos sec), Número de ramos terciários (Nº ramos terc), Comprimento do Maior Ramo (Comp. Maior ramo).

As variáveis massas seca total, massa seca de folhas e massa seca de caule, apresentaram efeito linear em função das doses de N (Figura 7).

A aplicação de nitrogênio proporcionam incrementos na produção de biomassa de folhas e variáveis de crescimento como índice de área foliar (TAVARINI *et al.*, 2015 ; FRANCISCO, 2015; ZAHIDA *et al.*, 2013). Essas variáveis estão associadas diretamente com a metabolização do elemento nitrogênio, interferindo na síntese da enzima Ribulose

1-5 bifosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco), e assim, afetando o potencial produtivo da cultura pela síntese enzimática do aparato fotossintético (TAVARINI *et al.*, 2015), refletindo diretamente no desenvolvimento vegetal.

O desenvolvimento vegetal compreende numerosos processos tais como divisão celular, expansão celular, síntese de proteínas, elaboração dos materiais da parede celular e alterações qualitativas e quantitativas de organelas, sendo todos estes processos, influenciadas pelo estado nutricional da planta (FERRI, 1985).

Doses adequadas de nitrogênio podem interferir diretamente na produtividade primária das culturas (FERRI, 1985), ou seja, interferir diretamente sobre a produção de biomassa total, e outras variáveis como o número de ramificações.

Em estévia as variáveis relacionadas à produção de massa seca, a massa seca de folhas apresenta maior relevância, isso porque, os glicosídeos diterpênicos esteviosídeo e rebaudiosídeo A encontram-se em maior quantidade neste órgão (OROZCO *et al.*, 2010; HSIEH & GOODMAN, 2005).

A falta de diferenças na produção de massa seca de folhas entre as doses de nitrogênio aplicadas pode ser explicada pela interação de sinais externos, como foto período, interferindo diretamente no ciclo produtivo da cultura, e níveis de pH do solo que interfere diretamente na disponibilidade de nutrientes as plantas (YANG *et al.*, 2015). Outro fator, que se deve levar em consideração são as próprias necessidades nutricionais da cultura da estévia, bem como a capacidade de absorção de nitrogênio. A eficiência de absorção de nitrogênio pelas plantas é determinada por alguns fatores, tais como: absorção de nitrato ou amônio, estoque de nitrato, habilidade de mobilizar e translocar nitrogênio para órgãos dreno, e por fim, a adaptação à baixa disponibilidade de nitrogênio no meio (DUNCAN & BALIGAR, 1991).

Há estudos realizados com Asteráceas nativas do cerrado, principalmente *Vernonia herbacea*, que apontam que plantas cultivadas em casa de vegetação e tratadas com solução nutritiva, em substrato arenoso, apresentaram maior crescimento dos órgãos aéreos (TEIXEIRA *et al.*, 1997). Já Carvalho *et al.* (1998) verificaram que as plantas de *V. herbacea*, com aplicação de fertilização nitrogenada não aumentou a produção de biomassa aérea e subterrânea. Segundo o referido autor, plantas originadas de condições com baixa fertilidade de solo, submetidas a condições de alta fertilidade promovidas por

fertilizantes, podem promover mudanças no balanço nutricional de *V. herbacea*, reduzindo assim o desenvolvimento e ganho de biomassa de folhas, ramos e raízes da referida cultura.

O nitrogênio proveniente da matéria orgânica do solo pode ter suprido as necessidades da cultura fazendo com que as diferentes doses de adubação nitrogenada não tenham causado diferenças nas variáveis apresentadas nas Tabelas 10 e 11 para o genótipo G8.

Segundo Castro *et al.*(2003) o fotoperíodo desempenha papel importante no desenvolvimento das plantas, onde fotoperíodos longos possibilitam maior atividade fotossintética e, conseqüentemente, maior disponibilização e alocação de fotoassimilados para o crescimento dos seus diversos órgãos.

A estêvia, planta de dia curto, apresenta fotoperíodo crítico entre 12 e 13 horas (CEUNEN & GEUNS, 2013C). Dias longos promovem aumento no período de crescimento na cultura da estêvia afetando diretamente a produção de massa seca de folhas, comprimento dos ramos e seus índices de crescimento (CEUNEN & GEUNS, 2013C). Dias curtos, segundo os referidos autores, promovem um desenvolvimento acelerado da cultura com baixo acúmulo de biomassa, isso pelo fato da entrada precoce em estágio de florescimento.

Associado as mudanças nutricionais promovidas pelas diferentes doses de adubação nitrogenada, o fator fotoperíodo em declínio pode ter contribuído com a não observação de diferenças entre os tratamentos.

O fotoperíodo é um fator importante na modulação de vários genes na estêvia, genes estes relacionados ao acúmulo de biomassa (metabolismo primário) e à transcrição e síntese de glicosídeos de esteviol (YANG *et al.*, 2015). Dias curtos promovem a entrada em fase reprodutiva na cultura da estêvia (CEUNEN & GEUNS, 2013a, 2013b, 2013C). Sendo o experimento implantado no dia 15 de dezembro de 2015, fator esse influenciado pelo fenômeno El Niño, onde a região sofreu com três meses ininterruptos de chuvas, e também, devido às mudas utilizadas no experimento serem provenientes de propagação vegetativa, e não via sementes, que é a prática usual, promovendo assim o atraso no período de implantação. Dessa forma, o potencial produtivo da cultura ficou prejudicado devido à proximidade do solstício de verão, onde o fotoperíodo na região sofre gradativa

redução após a data de 21 de dezembro (Tabela 8). Embora altas dosagens de nitrogênio estivessem disponíveis para as plantas da parcela útil, a diminuição do foto período interferiu na metabolização desse nutriente, onde o acúmulo de biomassa sofre diminuição em decorrência da entrada em estágio reprodutivo (CEUNEN & GEUNS, 2013A, 2013B, 2013C), assim sendo, não apresentando diferenças entre as doses de nitrogênio aplicadas (Tabelas 10, 11 e Figura 7).

A produção de ramos secundários e terciários está diretamente relacionada com o acúmulo total de massa seca, ou seja, relacionado com o metabolismo primário da cultura. Segundo Pal *et al.* (2015), a produção de ramificações laterais em estêvia, está relacionada diretamente com o desenvolvimento do sistema radicular. O mesmo autor relata que sistemas radiculares mais desenvolvidos sintetizam maiores quantidades de citocininas, fitohormônios responsáveis pelo estímulo a ramificações laterais. Com a possível mudança no balanço nutricional do genótipo G8 com as diferentes doses de nitrogênio as plantas nutricionalmente desbalanceadas, e somando-se a isso a redução no fotoperíodo prejudicando o acúmulo de massa seca, as plantas apresentam baixo desenvolvimento do sistema radicular, e conseqüentemente, menor produção de citocininas (CARVALHO *et al.* 1998), não apresentando assim, diferenças entre os tratamentos nas variáveis número de ramos secundário e terciários (Tabela 10).

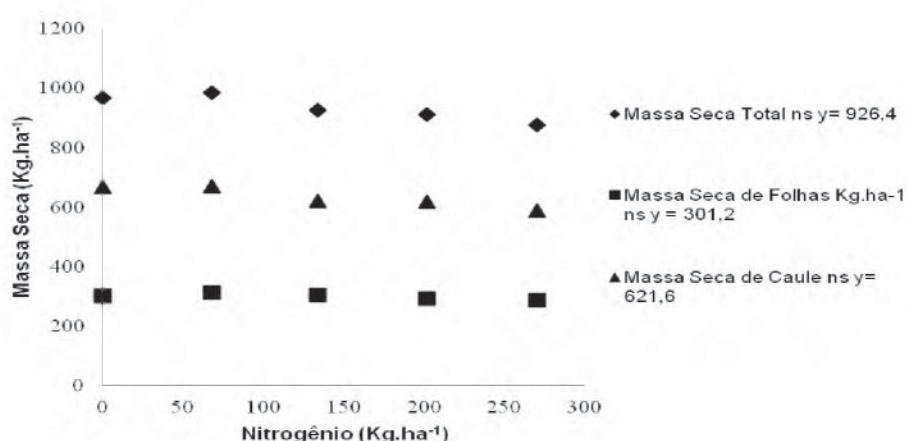


Figura 7. Produção de massa seca total, de folhas e de caule do genótipo de estêvia submetido a doses de nitrogênio; IFC, Campus Rio do Sul, SC, Brasil, 2015/2016.

As variáveis número de ramos secundários e número de ramos terciários foram representadas pela média em função das doses de nitrogênio (Figura 8).

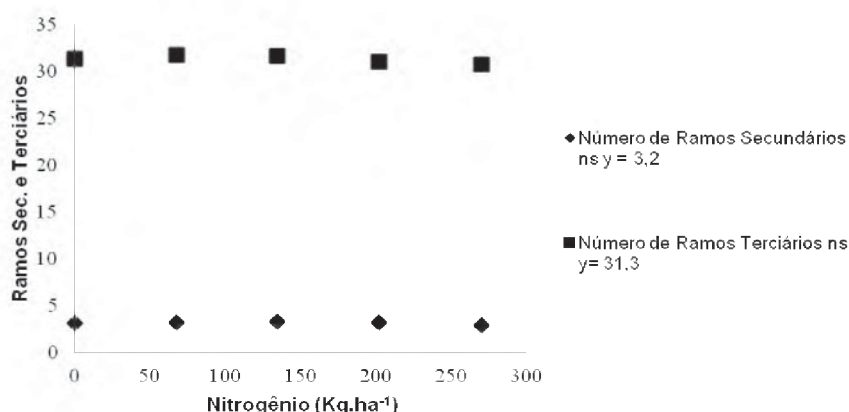


Figura 8. Número de ramos secundários e terciários do genótipo de estêvia submetido a doses de N; IFC, Campus Rio do Sul, SC, Brasil, 2015/2016.

As variáveis área foliar total, índice de área foliar, razão de área foliar, área foliar específica e razão de peso de folha não variaram com a adubação nitrogenada (Tabela 11).

Tabela 11. Médias por dose de adubação nitrogenada para as variáveis associadas aos índices de crescimento.

Nitrogênio (Kg.ha ⁻¹)	AFT ¹ (cm ²)	IAF (m ² .m ⁻²)	RAF (cm ² .g ⁻¹)	AFE (cm ² .g ⁻¹)	RPF (g.g ⁻¹)
0	397,31 ^{ns}	3,17 ^{ns}	35,47 ^{ns}	113,75 ^{ns}	0,31 ^{ns}
68	361,59	2,89	26,33	85,25	0,31
135	371,44	2,97	31,33	93,03	0,32
200	332,27	2,65	29,29	90,51	0,32
270	337,58	2,70	30,19	91,86	0,33

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. ¹ Área foliar total (AFT), índice de área foliar (IAF), razão de área foliar (RAF), área foliar específica (AFE), Razão de peso de folha (RPF).

A área foliar total de uma cultura é um importante parâmetro a ser avaliado, isso porque, essa variável representa a capacidade de um genótipo em manter uma área foliar por um maior período, possibilitando um melhor desempenho do aparato fotossintético. Através da área foliar total de uma cultura é possível se calcular os demais índices de crescimento como IAF, AFE, RAF e RPF.

A não observação de diferenças nas diferentes doses de nitrogênio aplicadas, levando-se em conta a variável AFT, pode ser explicada pela fonte de N aplicada, onde altas doses de ureia, convertidas em NH_4 , promovem segundo apontamentos de Carvalho *et al.* (1998), distúrbios no acúmulo de massa seca total. Esses distúrbios são promovidos pelo acúmulo de NH_4 no interior da célula vegetal que pode desacoplar a fotofosforilação oxidativa, e conseqüentemente, afetando o metabolismo da célula e todos os índices de crescimento (Tabela 11).

Além das desordens nutricionais, o fotoperíodo também pode ter promovido efeitos negativos nas variáveis associadas aos índices de crescimento. Como já relatado no presente trabalho, as plantas, independentemente do comportamento em relação ao fotoperíodo, apresentam maior crescimento e acúmulo de massa seca de folhas em situações de dias longos. Isso ocorre devido ao aumento da área foliar e da produção fotossintética (CASTRO *et al.*, 2003). A cultura da estévia, cultura de dias curtos, apresenta menor acúmulo de massa seca em situações de redução de fotoperíodo (CEUNEN & GEUNS, 2013C) e conseqüentemente redução na área foliar total refletindo nos demais índices.

O índice de área foliar (IAF) segundo Watson (1947) é a área total unilateral de tecido foliar por unidade de área de superfície de solo. Nessa variável também não foram observados diferenças entre os tratamentos (Tabela 11). Assim como a variável AFT não sofreu influências das diferentes doses de nitrogênio e influências do fotoperíodo decrescente, o IAF do genótipo de estévia, submetido a diferentes doses de nitrogênio, apresentaram iguais comportamentos. Os valores encontrados no presente trabalho são condizentes com os encontrados por Francisco (2015) na região da grande Curitiba.

Embora não constatadas diferenças entre as doses de N aplicadas, pode-se observar uma tendência à diminuição no IAF conforme o aumento das doses aplicadas. Esse comportamento pode ser explicado pelas disfunções nutricionais geradas pelas adubações nitrogenadas em diferentes doses que afeta diretamente a variável AFT.

A RAF segundo Magalhães (1979) expressa a área foliar útil para a fotossíntese, ou seja, é a área foliar que é usada para a produção de 1 g de massa seca, variável que também não foi alterada com a aplicação de N. A RAF pode sofrer diminuições em

consequência do autossombreamento, promovendo dessa forma uma diminuição da área foliar útil (SCOTT & BATCHELOR, 1979).

Sendo a RAF dependente da produção de massa seca total e da área foliar total, essa variável apresenta o mesmo comportamento das demais variáveis associadas ao crescimento vegetal, ou seja, influência gerada pela redução do fotoperíodo durante o período experimental. A RAF encontrada nas diferentes doses de N aplicadas no genótipo G8 é condizente com os resultados obtidos para o mesmo genótipo cultivado na região metropolitana de Curitiba por Francisco (2015).

A AFE segundo Benincasa (2003) é a relação entre a área foliar e a biomassa seca das folhas e que fornece um indicativo da área foliar necessária para a síntese de 1 g de massa seca de folhas. Como o acúmulo de esteviosídeo e rebaudiosídeo A se dá, na grande totalidade, nas folhas (SOTO & DEL VAL, 2002), a variável AFE apresenta grande relevância nas presentes avaliações.

A variável AFE, assim como a área foliar total e a razão de área foliar, não apresentou diferenças entre as doses de nitrogênio aplicadas. A não observação entre as diferentes doses de adubação nitrogenada (Tabela 11) podem ser atribuídas ao fotoperíodo em declínio (CEUNEN & GEUNS, 2013 A).

O fotoperíodo promove influências na AFE de guaco (CASTRO et al., 2003). Segundo o autor, fotoperíodos de 16 a 20 h promovem uma redução na AFE da cultura do guaco em comparação a fotoperíodos de 8 a 12h, isso pelo fato das folhas de guaco submetidas à fotoperíodos mais longos produzirem folhas mais espessas, resultando em maior produção de massa seca de folhas. Esse comportamento não é observado no presente trabalho com o G8 avaliado sob as diferentes doses de adubação nitrogenada (Tabela 10 e 11).

Francisco (2015) avaliando genótipos de estévia nas condições de clima e solo da grande Curitiba obteve valores bastante divergentes entre duas situações de cultivo, uma com o fotoperíodo crescente e o segundo com o foto período decrescente. O autor obteve maiores produções de biomassa em situações de fotoperíodo crescente, onde o ciclo de crescimento foi consideravelmente maior, diferença de 114 dias de ciclo para a condição de fotoperíodo crescente contra 84 dias de ciclo em situação de fotoperíodo decrescente. Os valores obtidos para a variável MSF por Francisco (2015) na situação de foto período

decrecente foram 75,14% menor que os valores obtidos para a mesma variável numa condição de fotoperíodo crescente.

Ao avaliar os índices de crescimento, em específico a variável AFE, Francisco (2015) obteve valores para o genótipo G8, o mesmo avaliado no presente trabalho, de $136,20 \text{ cm}^2.\text{g}^{-1}$, contra o valor médio de $94,88 \text{ cm}^2.\text{g}^{-1}$ encontrado no presente trabalho, ou seja, 43,5 % superior. Assim, podemos constatar que o foto período em decréscimo influencia negativamente os índices de crescimento, informação esta em consonância com os valores obtidos por Francisco (2015), não só para a variável AFE, mas também, pra outras variáveis como IAF e RAF.

Os valores de AFE encontrados para as diferentes doses de nitrogênio aplicadas na cultura da estévia no presente trabalho, não apresentaram diferenças devido ao acúmulo de massa seca de folhas serem influenciados pelo fotoperíodo decrescente (CEUNEN & GEUNS, 2013C), também corroborando com as informações geradas por Francisco (2015).

O fotoperíodo decrescente pode ter influenciado na standardização dos efeitos das diferentes doses de nitrogênio aplicadas, onde o ciclo mais curto de desenvolvimento do G8, não possibilitou o maior aproveitamento das doses de nitrogênio disponíveis.

A RPF é uma variável importante para a determinação do acúmulo de biomassa, trata-se de um parâmetro fisiológico que expressa a fração de massa seca não exportada das folhas para o resto da planta. Francisco (2015) obteve valores de RPF para o genótipo G8 cultivado na região metropolitana de Curitiba igual a $0,34 \text{ g.g}^{-1}$. Os resultados obtidos no presente trabalho variaram de $0,31$ a $0,33 \text{ g.g}^{-1}$.

Em média, 90% do acúmulo de biomassa das plantas ocorre pela atividade fotossintética e os 10 % restantes pela absorção de nutrientes minerais do solo (KRAMER & KOZLOWSKI, 1979). Nesse contexto, a não observação de diferenças entre as dosagens de adubação nitrogenadas aplicadas (Tabela 11) pode ser explicada por problemas associados à síntese de enzimas associadas ao aparato fotossintético, e também, a diminuição da área foliar induzida pelo foto período em decréscimo.

A redução do fotoperíodo promove aceleração no ciclo da cultura da estévia, porém com menor acúmulo de massa seca (CEUNEN & GEUNS, 2013C). Segundo o autor, o

foto período em declínio promove diminuição do número de entrenós nos ramos, interferindo assim na massa de folhas produzidas refletindo negativamente na RPF.

A relação entre a AFT, IAF, AFE, RAF e RPF em função das doses de N testadas pode ser representada por meio das médias de cada variável (Figuras 9 e 10).

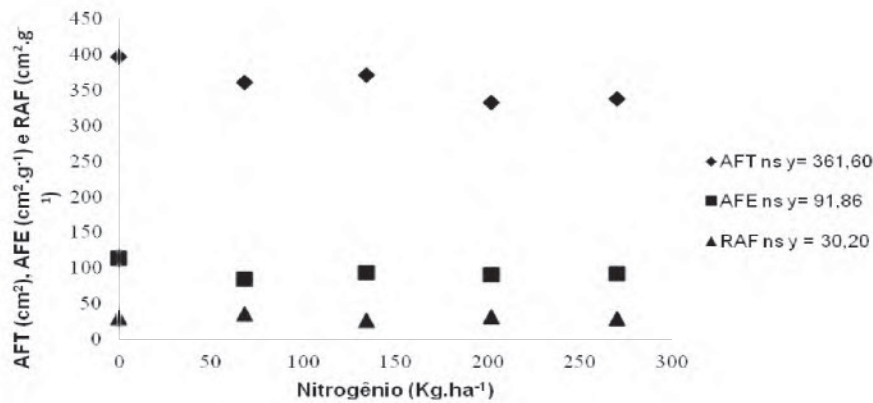


Figura 9. Área foliar total (AFT), área foliar específica (AFE) e razão de área foliar (RAF) das plantas de estêvia na parcela útil submetidas a diferentes doses de nitrogênio; IFC, Campus Rio do Sul, SC, Brasil, 2015/2016.

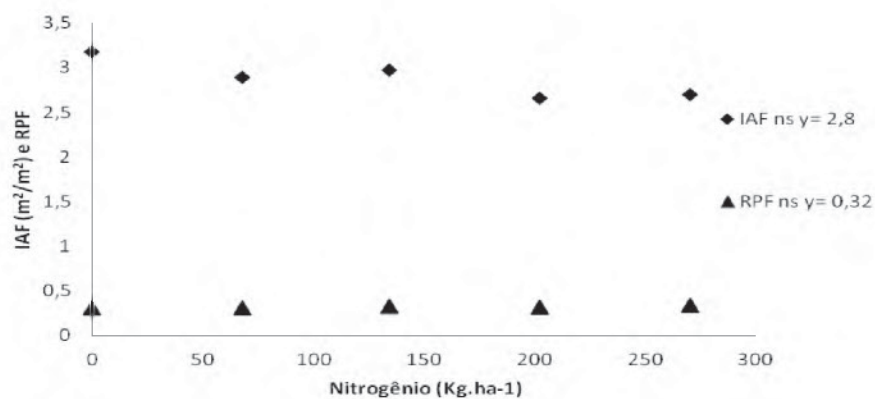


Figura 10. Índice de área foliar (IAF) e razão de peso das folhas (RPF) do genótipo de estêvia submetido a doses de nitrogênio; IFC, Campus Rio do Sul, SC, Brasil, 2015/2016.

Produção de Esteviosídeo e Rebaudiosídeo A

O teor de esteviosídeo, rebaudiosídeo A, razão entre rebaudiosídeo A/esteviosídeo, produtividade de esteviosídeo e produtividade de rebaudiosídeo A não variaram com a aplicação de nitrogênio (Tabela 12).

Tabela 12. Médias por dose de adubação nitrogenada para as quatro variáveis associadas ao acúmulo de glicosídeos de esteviol. Est (Esteviosídeo), Reb A (Rebaudiosídeo A).

Nitrogênio (Kg.ha ⁻¹)	Teor Est (mg g ⁻¹)	Teor Reb A (mg g ⁻¹)	Razão Reb A.Est ⁻¹	Prod.Est (Kg.ha ⁻¹)	Prod.Reb A (Kg.ha ⁻¹)
0	122,14 ^{ns}	37,53 ^{ns}	0,34 ^{ns}	36,59 ^{ns}	11,29 ^{ns}
68	106,14	40,95	0,39	33,35	12,89
135	96,14	38,13	0,40	29,29	11,61
200	99,93	42,15	0,43	29,31	12,38
270	95,60	40,66	0,44	27,37	11,65

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Teor de esteviosídeo (Teor Est mg g⁻¹), teor de rebaudiosídeo A (Teor Reb A mg g⁻¹), razão entre rebaudiosídeo A : esteviosídeo (Razão Reb.Est⁻¹), produção de esteviosídeo por hectare (Prod.Est Kg.ha⁻¹), produção de rebaudiosídeo A por hectare (Prod.Reb A Kg.ha⁻¹).

A relação das variáveis produtividade de esteviosídeo e rebaudiosídeo A com as doses de N podem ser representadas pela média das variáveis (Figura 11).

A síntese de metabólitos secundários sofre influência de vários fatores, um deles é a própria competição por nutrientes com o metabolismo primário. Em situações de estresses abióticos, as plantas priorizam a manutenção do metabolismo primário e a proteção do aparato fotossintético através da fotorrespiração (TAIZ & ZEIGER, 2013).

No trabalho de Francisco (2015) fica evidente a alta correlação entre produção de massa seca de folhas com teores de esteviosídeo, e também, com a produção de esteviosídeo por hectare. No presente trabalho não foi observado incremento no teor de esteviosídeo (Tabela 12). Também não foram observados incrementos na produtividade de esteviosídeo, reflexo direto da não observação de diferenças na produção de massa seca de folhas nas diferentes doses de N (Tabela 11 e 12).

A não observação do efeito das doses de nitrogênio no teor e produtividade de esteviosídeo é reflexo direto da não observação de diferenças no acúmulo de biomassa e

nos índices de crescimento, que sofreram efeitos diretos promovidos pelo decréscimo no foto período (CEUNEN & GEUNS, 2013C).

O teor de rebaudiosídeo A e a produção do referido metabólito seguem a mesma tendência do esteviosídeo, ou seja, a não observação de diferenças entre os tratamentos (Tabela 12). A não observação de diferenças no teor e produtividade de rebaudiosídeo A, assim como o esteviosídeo, pode ser explicada por efeitos na diminuição do ciclo de crescimento promovido pela diminuição do fotoperíodo (CEUNEN & GEUNS, 2013 C).

Francisco (2015) avaliando o teor e produtividade de esteviosídeo e rebaudiosídeo A de genótipos de estévia em condições de fotoperíodo decrescente na região da grande Curitiba mostra uma redução de 27,9% no teor de esteviosídeo e 36,6% no teor de rebaudiosídeo A. Este comportamento pode estar associado, segundo o autor, a condições ambientais menos favoráveis, como fotoperíodo em declínio, promovendo menor de desenvolvimento.

No presente trabalho observamos menor produção de MSF em decorrência do menor período de desenvolvimento do G8 devido a condições ambientais desfavoráveis, as mesmas citadas por Francisco (2015). Essas condições ambientais, fotoperíodo em declínio, proporcionam segundo Ceunen & Geuns (2013 A) menor acúmulo de massa seca de folhas, e conseqüentemente, menor produtividade de esteviosídeo e rebaudiosídeo A (Tabela 12).

Além das influências geradas pelo fotoperíodo em declínio, diferentes classes de solo, com diferentes níveis de pH, podem interferir na produtividade da estévia (ZAMAN *et al.*, 2015). As condições ambientais e de solo geram compatibilidade evolutiva da cultura com o tipo de solo e a disponibilidade de nutrientes e água (ZAMAN *et al.*, 2015). Solos com pH elevado, solos calcários e solos corrigidos com altas doses de calcário, prejudicam o desenvolvimento da cultura da estévia, prejudicando o acúmulo de biomassa (ZAMAN *et al.*, 2015). O manual de calagem e adubação para os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina recomenda a correção do solo destinado ao cultivo da estévia com adição de calcário para atingir pH 6,0, sendo este pH, segundo Zaman *et al.* (2015), não indicado para a cultura. Segundo o mesmo autor, a cultura da estévia apresenta melhores desempenhos produtivos em solos com pH ácidos, abaixo de 5,5. Dessa forma, os teores de glicosídeos diterpênicos, bem como o acúmulo de biomassa, podem ter

sofrido influências negativas tanto pelo fotoperíodo em declínio, como também, pela faixa inadequada de pH do solo da área experimental, que se encontrava em 5,2 antes da calagem.

A razão entre Reb A/Est é um fator determinante quanto à avaliação de novos genótipos de estévia. De acordo com Mota *et al.* (2011), a relação entre rebaudiosídeo A/esteviosídeo ideal para a indústria é 1. Não foram observadas diferenças entre as diferentes doses de N aplicadas quanto a variável razão Reb A/Est. Embora sem diferença, ocorre uma tendência em melhorar essa razão à medida que doses de N aumentam (Tabela 12). Essa tendência pode ser explicada pelas observações feitas por Francisco (2015), quando o autor avaliou o G8 em condições de fotoperíodo decrescente. O autor relata que a razão entre Reb A/Est observada no G8 obteve aumento quando cultivado em condições de fotoperíodo em declínio.

A síntese de metabólitos secundários é dependente do metabolismo primário, em específico, do metabolismo do carbono. O fator fotoperíodo em declínio pode ter influenciado negativamente a síntese de metabólitos secundários na cultura da estévia (Tabela 12 e Figura 11) em detrimento da menor produção de massa seca de folhas (CEUNEN & GEUNS, 2013C).

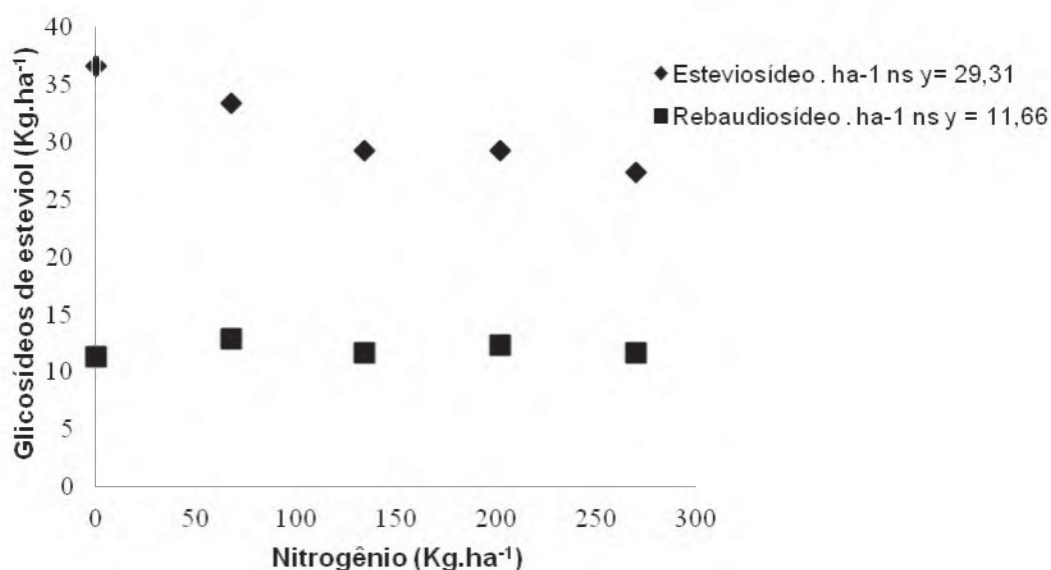


Figura 11. Produtividade de esteviosídeo e rebaudiosídeo A do genótipo de estévia submetido a doses de nitrogênio; IFC, Campus Rio do Sul, SC, Brasil, 2015/2016.

4.4 CONCLUSÕES

As diferentes doses de adubação nitrogenada não promovem incrementos na produção de biomassa na cultura da estévia produzidas em períodos de fotoperíodo em declínio nas condições produtivas do Alto Vale do Itajaí (SC).

Não foi observado incremento no teor e produtividade de glicosídeos diterpênicos em estévia com adubação nitrogenada em situações de fotoperíodo decrescente nas condições produtivas do Alto Vale do Itajaí (SC).

Nenhuma dose de nitrogênio aplicada nas condições produtivas com fotoperíodo em declínio no Alto Vale do Itajaí (SC) apresentaram razão Reb.Est¹ adequadas para a indústria, ou seja, próximas a 1.

REFERÊNCIAS

ALADAKATTI, Y.R. *et al.* Effect of nitrogen, phosphorus and potassium levels on growth and yield of stevia (*Stevia rebaudiana*Bertoni). **Karnataka Journal Agricultural Sciences**. v.25, n.1, p.25-29, 2012.

ANKIT. Global Stevia / Stevia rebaudiana Market (2013-2018): By Types (Liquid e Powdered); By Application (Dairy, Bakery, Canned Food, Beverages e Others) and By Geography. IndustryARC. 2014.

BENINCASA, M. M. P. **Análise de crescimento de plantas**: noções básicas. Jaboticabal: FUNEP, 2003. 42 p.

CANTARELLA, H. Nitrogênio. In: NOVAIS, R.F.; ALVAREZ V., V.H.; BARROS, N.F.; FONTES, R.L.F.; CANTARUTTI, R.B. & NEVES, J.C.L., eds. **Fertilidade do solo**. Viçosa, MG, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. p.375-470.

CARVALHO, M.A.M DE; ZAIDAN, L.B.P. Obtenção de plantas de *Stevia rebaudiana* através de estacas. **Pesquisa agropecuária brasileira**,v.30, n.2, p.201-206, 1995.

CARVALHO, M.A.M.; PINTO, M.M.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Inulin production by *Vernonia hecacea* as influenced by mineral fertilization and time of harvest. **Revista Brasileira de Botânica**, v.21, p. 275-280, 1998.

CASTRO, E.M. de. *et al.* Crescimento e anatomia foliar de plantas jovens de *Mikania glomerata* Sprengel (Guaco) submetidas a diferentes fotoperíodos. **Ciência Agrotécnica**. v.27, n.6, p.1293-1300, 2003.

CEUNEN, S.; GEUNS, J.M.C. Glucose, sucrose, and steviol glycoside accumulation in *Stevia rebaudiana* grown under different photoperiods. **Biol. Plant.** v.57, p.390-394, 2013 a.

CEUNEN, S.; GEUNS, J.M.C. Influence of photoperiodism on the spatiotemporal accumulation of steviol glycosides in *Stevia rebaudiana* (Bertoni). **Plant Sci.** v.198, p72-82, 2013 b.

CEUNEN, S.; GEUNS, J.M.C. *Stevia rebaudiana* grown under different photoperiods. **Phytochemistry**. v.89, p. 32 -38, 2013c.

CUNHA, J.L.X.L. *et al.* Comparação de métodos de área foliar em *Chrysobalanus icaco* L. **Agropecuária científica no semi-árido**, v.06, n.03, p.22-27, 2010.

DUNCAN, R.R.; BALIGAR, V.C. Genetic and physiological basis of nutrient uptake and use efficiency: an overview. In: DUNCAN, R.R.; BALIGAR, V.C. (Ed.). **Crops as enhancers of nutrient use**. New York: Academic Press, 1991, v.8, p. 239-282.

EMBRAPA. **Sistema de produção 5: Estévia**. 1ª.ed. Maringá, PR, Brasil, Steviafarma Industrial S/A, 2004. 55p.

EMBRAPA. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. 2ª.ed. Rio de Janeiro, Brasil, 2006. 306p.

ESPITA, C.M. *et al.* Rendimiento de *Stevia rebaudiana* Bert. bajo tres arreglos poblacionales en el Sinú Medio. **Revista U.D.C.A actualidad e divulgación científica**, v.12, n.1, p.151-161, 2009.

FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, n.6, p.1039-1042, 2011.

FERRI, M. G. **Fisiologia Vegetal**. Volumes I e II. 2ª ed. São Paulo: EPU, 1985. 2v.

FRANCISCO, F. **Acúmulo de biomassa, produção de esteviosídeo e rebaudiosídeo A e tolerância à geada e ao acamamento de acessos de *Stevia rebaudiana* bert.** 2015. 72p. Dissertação (Mestrado – Área de Concentração em Metabolismo Secundário) Programa de pós-graduação em Agronomia Produção vegetal da Universidade Federal do Paraná, PR, Brasil.

GOBBO-NETO, L; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v.30, n.2, p.374-381, 2007.

HSIEH, M.; GOODMAN, H. The Arabidopsis IspH homolog is involved in the plastid nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. **Plant Physiol.** v.138, n. 2, p.641-653, 2005.

JARMA, A. *et al.* Fisiología de estevia (*Stevia rebaudiana*) en función de la radiación en el Caribe colombiano. II. Análisis de crecimiento. **Agronomía Colombiana**, v.24, n.1, p.38-47, 2006.

KOLB, N. *et al.* Analysis of sweet diterpeno glycosides from *Stevia rebaudiana*: Improved HPLC Method. **Journal of agriculture, food and chemistry**, v.49, p.4538 – 4541. 2001.

KRAMER, P.J.; KOZLOWSKI, T.T. **Physiology of wood plants**. New York: Academic Press, 1979. 811p.

MAGALHÃES, A.C.N. Análise quantitativa do crescimento. In: FERRI, M.G. **Fisiologia Vegetal**. EPU/EDUSP, São Paulo. 1979. v. 1, p. 331-350.

MANDAL, S. *et al.* Arbuscular mycorrhiza enhances the production of stevioside and rebaudiosídeo A in *Stevia rebaudiana* via nutritional and non-nutritional mechanisms. **Applied soil ecology**, v.72, p.187-194, 2013.

MANDAL, S. *et al.* Enhanced production of steviol glycosides in mycorrhizal plants: A concerted effect of arbuscular mycorrhizal symbiosis on transcription of biosynthetic genes. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.89, p.100-106. 2015.

MOTA, TR. *et al.* Seleção de clones de elite de *Stevia rebaudiana*(Bert.) Bertoni com ênfase no teor do rebaudiosídeo A e a atividade antioxidante. Anais eletrônicos. VII EPCC – ENCONTRO INTERNACIONAL DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA CESUMAR. CESUMAR – Centro Universitário de Maringá, Editora CESUMAR, Maringá, Paraná, Brasil. Disponível em http://www.cesumar.br/prppge/pesquisa/epcc2011/anais/thatiane_rodrigues_MOTA_3.pdf. Acesso em: 20 jun. 2015.

MUELLER, S. *et al.* Produtividade de tomate em função de doses de nitrogênio. **Agropecuária Catarinense**, v.28, n.1, p.87-91, 2015.

OROZCO, A.J. *et al.* Síntesis de esteviosidos en estévia (*Stevia rebaudiana* Bert.). **Acta Biologica Colombiana**, v.15, n.1, p.289-294, 2010.

PAL, P. K.; MAHAJAN, M.; PRASAD, R.; PATHANIA, V.; SINGH, N.; AHUJA, P.S. Harvesting regimes to optimize yield and quality in annual and perennial *Stevia rebaudiana* under sub-temperate conditions. **Industrial Crops and Products**, v. 65, p. 556–564, 2015. DOI: 10.1016/j.indcrop.2014.09.060.

SCOTT, H. D.; BATCHELOR, J. T. Dry weight and leaf area productions rates of irrigated determinate Soybeans. **Agronomy Journal**, Madson, v. 71, p. 782, 1979.

SILVA, F de A.S; AZEVEDO, C.A.V de. Principal components analysis in the software Assistat-Statistical Attendance. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7, 2009, RENO-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIÊNCIA DO SOLO-SBCS. COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO - RS/SC. SBCS. 2016. **Manual de calagem e adubação para os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**. 11^a ed. Porto Alegre: Núcleo Regional Sul - Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 376p.

SOTO, A.; DEL VAL, S. Extracción de los principios edulcorantes de la *Stevia rebaudiana*. **Ciencias Agr. y Tecnología de los Alimentos**. v.20, p.5-9, 2002.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5.ed. Porto Alegre: Artemed, 2013. 954p.

TAVARINI, S. *et al.* Effect of nitrogen fertilization and harvest time on steviol glycosides, flavonoid composition and antioxidant properties in *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.63, n. 31, p.7041-7050, 2015.

TEIXEIRA, L. *et al.* Effect of mineral nutrients on growth and fructan contents in plants of *Vernonia herbacea*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.9, p.89-96, 1997.

YADAV, A.K, *et al.* A review on the improvement of stevia [*Stevia rebaudiana* Bertoni]. **Canadian Journal of Plant Science**, v.91, p.1-27, 2011.

WATSON, D.J. Comparative physiological studies on growth of field crops. I. Variation in net assimilation rate and leaf area between species and varieties, and within and between years. **Annals of Botany**, v.11, n.1, p. 41-76, 1947.

YANG, Y. *et al.* Environmental cues induce changes of steviol glycosides contents and transcription of corresponding biosynthetic genes in *Stevia rebaudiana*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 86, p.174-180, 2015.

ZAHIDA, R. *et al.* Effect of different levels of farmyard manure and nitrogen on the yield and nitrogen uptake by stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni). **African Journal of Agriculture Research**, v.8, n.29, p. 3941-3945, 2013.

ZAMAN, M.M; CHOWDHURY, M.A.H; CHOWDHURY, T. Growth parameters and leaf biomass yield of stevia (*Stevia rebaudiana*, Bertoni) as influenced by different soil types of Bangladesh. **Journal of the Bangladesh Agricultural University**, v.13, n.1, p.31-37, 2015.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os genótipos G12 e G8 se destacaram em relação aos demais, sendo o genótipo G8 superior em relação aos demais no acúmulo de RebA e razão RebA/Est, porém menos produtivo no acúmulo de biomassa que o genótipo G12. O Genótipo G12 apresenta folhas maiores que o genótipo G8, apresentando dados produtivos como AFT e IAF superiores aos demais genótipos avaliados, porém, não apresentando razão Reb A.Est⁻¹ favorável aos padrões da indústria.

Nenhum dos genótipos avaliados nas condições do Alto Vale do Itajaí apresentaram razão Reb A.Est⁻¹ favoráveis a indústria, isso se deve, principalmente, a problemas de fertilidade do solo associado com faixas de pH inadequadas a cultura. Há necessidade de mais estudos nas condições do Alto Vale do Itajaí com faixas de pH, densidades de cultivo, época de plantio, e níveis de adubação com adubos potássicos mais apropriados. O genótipo G8 por apresentar IAF inferior, pode apresentar produtividades mais satisfatórias em densidades de plantio mais altas. Quanto ao pH do solo, condições de solos mais ácidos podem favorecer o melhor desenvolvimento da cultura.

O plantio da estêvia no início da safra de verão da região, principalmente através de mudas produzidas a partir de sementes, época em que o fotoperíodo na região é crescente, pode promover incrementos na produção de biomassa e acúmulo de glicosídeos diterpênicos. Dessa forma, há necessidade de mais estudos avaliando diferentes épocas de plantio através da utilização de mudas produzidas a partir de sementes com objetivo de melhorar o potencial produtivo da cultura na região do Alto Vale do Itajaí.

As doses de nitrogênio estudadas precisam ser avaliadas com doses adequadas de adubação com potássio e micronutrientes. A campo fatores como nível de pH do solo elevado para os padrões da cultura (YANG *et al.*, 2015) podem ter contribuído para a não observação de efeitos significativos entre as diferentes doses de N, havendo maior

necessidade de estudos a campo para avaliar os efeitos de diferentes doses de nitrogênio sobre a modulação gênica e consequentemente maior acúmulo de glicosídeos de esteviol.

REFERÊNCIAS

ALADAKATTI, Y.R. *et al.* Effect of nitrogen, phosphorus and potassium levels on growth and yield of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni). **Karnataka Journal Agricultural Sciences**. v.25, n.1, p.25-29, 2012.

ALVAREZ, M. *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni: estado atual do conhecimento. Maringá. **FUEM**. 118p. 1984.

ANKIT. Global Stevia / *Stevia rebaudiana* Market (2013-2018): By Types (Liquid e Powdered); By Application (Dairy, Bakery, Canned Food, Beverages e Others) and By Geography. IndustryARC. 2014.

ANTON, S.D. *et al.* Effects of stevia, aspartame, and sucrose on food intake, satiety, and postprandial glucose and insulin levels. **Appetite**, v.55, p.37–43, 2010.

BENINCASA, M. M. P. **Análise de crescimento de plantas**: noções básicas. Jaboticabal: FUNEP, 2003. 42 p.

BONDAREV, N. I. *et al.* Morphology and ultrastructure of trichomes of intact and in vitro plants of *Stevia rebaudiana* Bertoni with reference to biosynthesis and accumulation of steviol glycosides. **Moscow University Biological Sciences Bulletin**. v. 65, n. 1, p. 12-16. 2010

BRANDLE, J.E.; STARRATT, A.N.; GIJZEN, M. *Stevia rebaudiana*: Its agricultural, biological, and chemical properties. **Canadian Journal of Plant Science**, v.78, p.527-536, 1998.

BRANDLE, J.; RICHMAN, A.; SWANSON, A.; CHAPMAN, B. Leaf ESTs from *Stevia rebaudiana*: A resource for gene discovery in diterpeno synthesis. **Plant Mol Biol**. v.50, p.613-622, 2002.

BRANDLE, J.; TELMER, P.G. Steviol glycoside biosynthesis. **Phytochemistry**, v.68, p.1855-1863, 2007.

BRASIL. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Secretaria do Comércio Exterior. Programa AliceWeb. 2014. Disponível em <<http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br/>>. Acessado em 04/05/2017.

CANTARELLA, H. **Nitrogênio**. In: Novaes RF, Alvares VH, Barros NF. **Fertilidade do solo**. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa, Minas Gerais, Brasil, 2007. p.375-470.

CARVALHO, M.A.M.; ZAIDAN, L.B.P. 1995. Obtenção de plantas de *Stevia rebaudiana* através de estacas. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.30, n.2, p.201-206, 1995.

CARVALHO, M.A.M.; PINTO, M.M.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Inulin production by *Vernonia hebacea* as influenced by mineral fertilization and time of harvest. **Revista Brasileira de Botânica**, v.21, p. 275-280, 1998.

CASTRO, E.M. de. *et al.* Crescimento e anatomia foliar de plantas jovens de *Mikania glomerata* Sprengel (Guaco) submetidas a diferentes fotoperíodos. **Ciência Agrotécnica**. v.27, n.6, p.1293-1300, 2003.

CEUNEN, S.; GEUNS, J.M.C. Glucose, sucrose, and steviol glycoside accumulation in *Stevia rebaudiana* grown under different photoperiods. **Biol. Plant**. v.57, p.390-394, 2013 a.

CEUNEN, S.; GEUNS, J.M.C. Influence of photoperiodism on the spatiotemporal accumulation of steviol glycosides in *Stevia rebaudiana* (Bertoni). **Plant Sci**. v.198, p72-82, 2013 b.

CEUNEN, S.; GEUNS, J.M.C. *Stevia rebaudiana* grown under different photoperiods. **Phytochemistry**. v.89, p. 32 -38, 2013c.

CHEN, T.H.; CHEN, S.C.; CHAN, P.; CHU, Y.L.; YANG, H.Y.; CHENG, J.T. Mechanism of the hypoglycemic effect of stevioside, a glycoside of *Stevia rebaudiana*. **Planta Med**. v.71, p.108-113, 2005.

CUNHA, J.L.X.L. *et al.* Comparação de métodos de área foliar em *Chrysobalanus icaco* L. **Agropecuária científica no semi-árido**, v.06, n.03, p.22-27, 2010.

DARISE, M.; 1(1-10DA, H.; MIZUTANI, K.; KÂSAI, R.; TANAXA, O. Chemical constituents of iowers of *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Agricultural and Biological Chemistry**. v.47, n. 1, p. 133-135, 1983.

DUNCAN, R.R.; BALIGAR, V.C. Genetic and physiological basis of nutrient uptake and use efficiency: an overview. In: DUNCAN, R.R.; BALIGAR, V.C. (Ed.). **Crops as enhances of nutrient use**. New York: Academic Press, 1991, v.8, p. 239-282.

EMBRAPA. **Sistema de produção 5: Estévia**. 1ª.ed. Maringá, PR, Brasil, Steviafarma Industrial S/A, 2004. 55p.

EMBRAPA. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. 2ª.ed. Rio de Janeiro, Brasil, 2006. 306p.

ESPITA, C.M. et al. Rendimiento de *Stevia rebaudiana* Bert. bajo tres arreglos poblacionales en el Sinú Medio. **Revista U.D.C.A actualidad e divulgación científica**, v.12, n.1, p.151-161, 2009.

FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, n.6, p.1039-1042, 2011.

FERRI, M. G. **Fisiologia Vegetal**. Volumes I e II. 2ª ed. São Paulo: EPU, 1985. 2v.

FRANCISCO, F. **Acúmulo de biomassa, produção de esteviosídeo e rebaudiosídeo A e tolerância à geada e ao acamamento de acessos de *Stevia rebaudiana* bert.** 2015. 72p. Dissertação (Mestrado – Área de Concentração em Metabolismo Secundário) Programa de pós-graduação em Agronomia Produção vegetal da Universidade Federal do Paraná, PR, Brasil.

FREDERICO, A. P.; RUAS, P. M.; MARIN-MORALES, M. A.; FUAS, C. F.; NAKAJIMA, J. N. Chromosome studies in some *Stevia* Cav. (Compositae) species from Southern Brazil. **Braz.J. Genet**, v.19, p.605-609, 1996.

GARDANA, C. et al. Evaluation of steviol and its glycosides in *Stevia rebaudiana* leaves and commercial sweetener by ultra-high performance liquid chromatography– mass spectrometry. **Journal of Chromatogr A**, v.1217, p.1463–1470, 2010.

GATTONI, L. A. Caa-Jhee A wild shrub native to Paraguay (*Stevia rebaudiana* Bert.) September. **Typed Material**. STICA, Paraguay. 1945.

GEUNS, J.; AUGUSTIJNS, P.; MOLS, R.; BUYSE, J.; DRIESSEN, B. Metabolismo f stevioside in pigs and intestinal absorption characteristics of stevioside, rebaudiosídeo A and steviol. **Food Chem Toxicol**. v.41, p.1599-1607, 2003.

GEUNS, J.M.C. Stevioside. **Phytochemistry**. v.64, p.913-921, 2003.

GEUNS, J.M.C. et al. Metabolismo f stevioside in pigs and intestinal absorption characteristics of stevioside, rebaudiosídeo A and steviol. **Food Chem Toxicol**. v.41, p.1599-1607, 2003.

GIUFFRÉ, L.; ROMANIUK, R.; CIARLO, E. *Stevia*, ka'a he'e, wild sweet herb from South America - An overview. **Emir. J. Food Agric.**, v.25, n.10, p.746-750, 2013.

GOBBO-NETO, L; Lopes, N.P. 2007. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v.30, n.2, p.374-381, 2007.

GLOBIG, S. et al. Continuous light effects on photosynthesis and carbon metabolism in tomato. **Acta Horticulturae**, n.418, p.141-151, 1997.

GREGERSEN, S.; JEPPESEN, P.; HOLST, J.; HERMANSEN, K. Antihyperglycemic effects of stevioside in type 2 diabetic subjects. **Metabolism**. v.53, n.1, p.73-76, 2004.

GUEVARA-GARCÍA, A.; SAN ROMAN, C.; ARROYO, A.; CORTES, M.; DE LA LUZ GUTIÉRREZ-NAVA, M.; LEÓN, P. Characterization of the Arabidopsis clb6 mutant illustrates the importance of Posttranscriptional regulation of the Methyl-D-Erythritol 4-phosphate Pathway. **Plant Cell**. v.17, n.2, p.628-643, 2005.

HAJIHASHEMI, S., GEUNS, J.C., EHSANPOUR, A. Gene transcription of steviol glycoside biosynthesis in *Stevia rebaudiana* Bertoni under polyethylene glycol, paclobutrazol and gibberellic acid treatments in vitro. **Acta Physiol. Plant**, v.35, p.2009-2014, 2013.

HSIEH, M.; GOODMAN, H. The Arabidopsis IspH homolog is involved in the plastid nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. **Plant Physiol**. v.138, n. 2, p.641-653, 2005.

HUMPHREY, T.V., RICHMAN, A.S., MENASSA, R., BRANDLE, J.E. Spatial organization of four enzymes from *Stevia rebaudiana* that are involved in steviol glycoside synthesis. **Plant Mol. Biol**. v.61, p.47-62, 2006.

IKAN, R.; CRAMMER, V.; WEINSTEIN, V.; ZIV, Z. Sweet diterpeno glycoside and their biological activity. **Israel Journal Botany**, Jerusalem, v.41, p.106, 1992.

JARMA, A.; RENGIFO, T.; ARAMÉNDIZ-TATIS, H. Fisiología de estevia (*Stevia rebaudiana*) em función de La radiación en el caribe colombiano. II. Análises de crecimiento. **Agronomia Colombiana**, v.24, n.1, p.38-47, 2006.

JEPPESEN, P.; GREGERSEN, S.; POULSEN, R.; HERMANSEN, K. Stevioside acts directly on pancreatic 13 cells to secrete insulin: Actions independent of cyclic adenosine monophosphate and adenosine triphosphate-sintese K⁺-Channel Activity. **Metabolism**. v.149, n. 2, p.208-214, 2000.

JEPPESEN, P.; GREGERSEN, S.; ALSTRUP, K.; HERMANSEN, K. Stevioside induces antihyperglycemic, insulinotropic and glucagonostatic effects *in vivo*: Studies in the diabetic Goto-Kakizaki (GK) rats. **Phytomedicine**. p.9-14, 2002.

KASAHARA, H.; HANADA, A.; KUZUYAMA, T.; TAKAGI, M.; KAMIYA, Y.; YAMAGUCHI, S. Contribution of the mevalonate and methylerythritol phosphate Pathway to the biosynthesis of gibberellins in Arabidopsis. **Journal Biol. Chem**. v.277, n.47, p.45188-45194, 2002.

KOLB, N. et al. Analysis of sweet diterpeno glycosides from *Stevia rebaudiana*: Improved HPLC Method. **Journal of agriculture, food and chemistry**, v.49, p.4538 – 4541. 2001.

KRAMER, P.J.; KOZLOWSKI, T.T. **Physiology of wood plants**. New York: Academic Press, 1979. 811p.

KUMAR, R.; SHARMA, S.; SOOD, S. Yield components, light interception and marker compound accumulation of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) affected by planting material and plant density under western Himalayan conditions. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 60, n.12, p. 1731–1745, 2014a. DOI: 10.1080/03650340.2014.909029

LADYGIN, V.G; BONDAREV, N.I; SEMENOVA, G.A; SMOLOV, A.A; RESHETNYAK, O.V; NOSOV, A.M. Chloroplast ultrastructure, photosynthetic apparatus activities and production of steviol glycosides in *Stevia rebaudiana* *in vivo* and *in vitro*. **Biol Plantarum** v.52, p.9–16, 2008.

LAMBERS, H.; CHAPIN, F. S.; PONS, T. L. **Plant physiological ecology**. 2.ed. New York: Springer, 2008. 610p.

LEMUS-MONDACA, R. et al. *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. **Food Chemistry**, v.132, p.1121-1132, 2012.

MAGALHÃES, A.C.N. Análise quantitativa do crescimento. In: FERRI, M.G. **Fisiologia Vegetal**. EPU/EDUSP, São Paulo. 1979. v. 1, p. 331-350.

MANDAL, S. et al. Arbuscular mycorrhiza enhances the production of stevioside and rebaudiosídeo A in *Stevia rebaudiana* via nutritional and non-nutritional mechanisms. **Applied soil ecology**, v.72, p.187-194, 2013.

MANDAL, S. et al. Enhanced production of steviol glycosides in mycorrhizal plants: A concerted effect of arbuscular mycorrhizal symbiosis on transcription of biosynthetic genes. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.89, p.100-106. 2015.

MELIS, M.S. Chronic administration of aqueous extract of *Stevia rebaudiana* in rats: renal effects. **Journal of Ethnopharmacology**, v.47, p.129-134, 1995.

MONDAÇA, R. L. et al. *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. **Food Chemistry**, v. 132, n. 3, p. 1121–1132. 2012.

MONTEIRO, R. Taxonomía e biología da reprodução de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. I Seminario Brasileiro sobre *Stevia rebaudiana* Bertoni. IV 1. Resumos ITAL Campinas 9/82. **Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Sao Paulo. Pagliosa, 1982.

MOTA, TR. et al. Seleção de clones de elite de *Stevia rebaudiana*(Bert.) Bertoni com ênfase no teor do rebaudiosídeo A e a atividade antioxidante. Anais eletrônicos. VII EPCC – ENCONTRO INTERNACIONAL DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA CESUMAR. CESUMAR – Centro Universitário de Maringá, Editora CESUMAR, Maringá, Paraná, Brasil. Disponível

em

http://www.cesumar.br/prppqe/pesquisa/epcc2011/anais/thatiane_rodrigues_MOTA_3.pdf. Acesso em: 20 jun. 2015.

MUELLER, S. et al. Produtividade de tomate em função de doses de nitrogênio. **Agropecuária Catarinense**, v.28, n.1, p.87-91, 2015.

NABETA, K.; KASAI, T.; SUGISAWA, H. Phytosterol from the callus of *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Agricultural and Biological Chemistry**. v.40, n.10, p.2103-2104, 1976.

OROZCO, A.J.; CAMACHO, M.E.; FISCHER, G. Síntesis de esteviosidos em estevia (*Stevia rebaudiana* BERT). **Acta bilogica Colombiana**, v.15, n.1, p.289-294, 2010.

OSHIMA, Y.; SAITO, I.; HIKINO, H. Sterebins E, F, Oand II, diterpenoids of *Stevia rebaudiana* leaves. **Phytochemistry**. v.27, n.2, p.624-626, 1988.

PAL, P. K.; MAHAJAN, M.; PRASAD, R.; PATHANIA, V.; SINGH, N.; AHUJA, P.S. Harvesting regimes to optimize yield and quality in annual and perennial *Stevia rebaudiana* under sub-temperate conditions. **Industrial Crops and Products**, v. 65, p. 556–564, 2015. DOI: 10.1016/j.indcrop.2014.09.060.

POORTER, H; GARNIER, E. Ecological significance of inherent variation in relative growth rate and its components. In: Pugnaire, F.I.; VALLADARES, F. (Eds). **Handbook of functional plant**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1999. p.81–120.

PORTUGAL, E.P. et al. Seleção de fungos micorrízicos arbusculares para estêvia, *Stevia rebaudiana* (bert.) Bertoni. **MultiCiência**, n.07, 2006.

RENEWICK, A.G. The use of a sweetener substitution method to predict dietary exposures for the intense sweetener rebaudioside A. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p.61-69, 2008.

REZIWANGGU, A.; JEPPESEN, P.; ROLFSEN, S.; XIAO, J.; HERMANSEN, K. Rebaudioside A potently stimulates insulin secretion from isolated mouse islets: Studies on the dose-, glucose-, and calcium-dependency. **Metabolism**. v.53, n.10, p.1378-1381, 2004.

RICHMAN, A.S.; GIJZEN, M.; GIJZEN, M.; STARRATT, AL N.; YAHG, Z.; BRANDLE, J.E. Diterpene synthesis in *Stevia rebaudiana*: recruitment and up-regulation of key enzymes from the gibberellin biosynthetic pathway. **The Plant Journal**, v.19, n.4, p.411-421, 1999.

RICHMAN, A.; SWANSON, A.; HUMPHREY, R.; CHAPMAN, R.; MCGARVEY, B.; POCS, R.; BRANDLE, J. Functional genomics uncovers three glucosyltransferases involved in the synthesis of the major sweet glucosides of *Stevia rebaudiana*. **The Plant Journal**, v.41, p. 56-67, 2005.

RODRIGUES, T.J.D., LEITE, I.C., SANTOS, D.M.M. 1998. **Roteiro Para Aulas Práticas De Fisiologia Vegetal**. Jaboticabal, FUNEP, 79 p. ilustr.

SCOTT, H. D.; BATCHELOR, J. T. Dry weight and leaf area productions rates of irrigated determinate Soybeans. **Agronomy Journal**, Madson, v. 71, p. 782,1979.

SHOCK, C. C. Experimental Cultivation of Rebaudi's Stevia in California. Agronomy Prog No. 122. Univ. of California, Davis,1982.

SHOLICHIN, M.; YAMAZAKI, K.; MIYAMA, R.;YAI-IARA, 5.; TANAKA, O. Labdane-Typediterpenes from *Stevia rebaudiana*. **Phytochemistry**.Oxford, v.19, p.326-327, 1980.

SERFATY, M.; IBDAH, M.; FISCHER, R.; CHAIMOVITSH, D.; SARANGA, Y.; DUDAI, N. Dynamics of yield components and stevioside production in *Stevia rebaudiana* grown under different planting times, plant stands and Harvesting regimes. **Industrial Crops and Products**, v.50, p.731-736, 2013. DOI: 10.1016/j.indcrop.2013.08.063.

SILVA, F de A.S; AZEVEDO, C.A.V de. Principal components analysis in the software Assistat-Statistical Attendance. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7, 2009, RENO-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIÊNCIA DO SOLO-SBCS. COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO - RS/SC. SBCS. 2016. **Manual de calagem e adubação para os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**. 11ª ed. Porto Alegre: Núcleo Regional Sul - Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 376p.

SOTO, A.; DEL VAL, S. Extracción de los principios edulcorantes de la *Stevia rebaudiana*. **Ciencias Agr. y Tecnología de los Alimentos**. v.20, p.5-9, 2002.

SUZUKI, H.; IKEDA,T.; MATSUMOTO, T.; NOGUSHI, M. Isolation and identification of rutin from cultured cells of *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Agricultural and Biological Chemistry, Tokyo**, v.40, n.4, p.819-820, 1976.

TAVARINI, S.; ANGELINI L.G. *Stevia rebaudiana* Bertoni as a source of bioactive compounds: the effect of harvest time, experimental site and crop age on steviol glycoside content and antioxidant properties. **Journal of the Science of Food and Agriculture** , v.93, p.2121–2129, 2013.

TAVARINI, S. et al. Effect of nitrogen fertilization and harvest time on steviol glycosides, flavonoid composition and antioxidant properties in *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.63, n. 31, p.7041-7050, 2015.

TADHANI, M.B.; SUBHASH, R. *In vitro* antimicrobial activity of *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v.5, n.1, p.557-560, june, 2006.

TADHANI, M.B.; PATEL, V.H.; SUBHASH, R. *In vitro* antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* leaves and callus. **Journal of food composition and analysis**, v.20, p.323-329, 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5.ed. Porto Alegre: Artemed, 2013. 954p.

TAKAHASHI, K., et al. Analysis of anti-rotavirus activity of extract from *Stevia rebaudiana*. **Antiviral Research**, v.49, p.15-24, 2001.

TEDESCO, M.J. et al. **Análises de solo, plantas e outros materiais**. Boletim técnico nº 5. 2ª Ed. Porto Alegre, UFRGS, 1995. 172p.

TEIXEIRA, L. et al. Effect of mineral nutrients on growth and fructan contents in plants of *Vernonia herbacea*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.9, p.89-96, 1997.

TOTTÉ, N.; CHARON, L.; ROHMER, M.; COMPERNOLLE, F.; BABOEUF, I.; GEUNS, J. Biosynthesis of the diterpenoid steviol, an entkaurene derivative from *Stevia rebaudiana* Bertoni, via the Methylerythritol Phosphate pathway. **Tetrahedron Lett**, v.41, p.6407-6410, 2000.

TOTTÉ, N.; VAN DEN ENDE, W.; VAN DAMME, E.; COMPERNOLLE, F.; BABOEUF, I.; GEUNS, J. Cloning and heterologous expression of early genes in Gibberellin and steviol biosynthesis via the Methylerythritol phosphate pathway in *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Can. Journal Bot**, v.81, n.5, p.517-522, 2003.

TRANAVIČIENĖ, T. et al. The effect of differential nitrogen fertilization on photosynthetic pigment and carbohydrate contents in the two winter wheat varieties. **Agronomy Research**, v.6, n.2, p.555 – 561, 2008.

TSANAVA, V.P.; SARDZHVELADZE, G.P.; KHAREBAVA, L.G. Studies on the volatile of *Stevia rebaudiana*. **Subtropicheskie Kul'tury**, v.3, p.73-77, 1989.

UTUMI, M.M.; MONNERAT, P.H.; PEREIRA, P.R.G.; FONTES, P.C.R.; GODINHO, V. de P.C. Deficiência de macronutrientes em estêvia: sintomas visuais e efeitos no crescimento, composição química e produção de esteviosídeo. **Revista Agropecuária Brasileira, Brasília**, v. 34, n.6, p.1039-1043, jun. 1999.

VASILAKOGLU, I. et al. Productivity of two stevia varieties under reduced irrigation and fertilization inputs. **Archives of Agronomy and Soil Science**, DOI: 10.1080/03650340.2015.1060554, 2015.

WATSON, D.J. Comparative physiological studies on growth of field crops. I. Variation in net assimilation rate and leaf area between species and varieties, and within and between years. **Annals of Botany**, v.11, n.1, p. 41-76, 1947.

YADAV, A.K. et al. A review on the improvement of stevia [*Stevia rebaudiana* Bertoni]. **Canadian Journal of Plant Science**, v.91, p.1-27, 2011.

YANG, Y.; HUANGA, S.; HANC, Y.; YUANB, H.; GUB, C.; ZHONGWEI WANG, Z. Environmental cues induce changes of steviol glycosides contents and transcription of corresponding biosynthetic genes in *Stevia rebaudiana*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 86, p.174-180, 2015.

ZAHIDA, R.; MUDASIR, R.; SUHAIL I.; SOULIHA, R.; FAYAZ AH.B. Effect of different levels of farmyard manure and nitrogen on the yield and nitrogen uptake by stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni). **African Journal of Agriculture Research**, v.8, n.29, p. 3941-3945, 2013.

ZAMAN, M.M; CHOWDHURY, M.A.H; CHOWDHURY, T. Growth parameters and leaf biomass yield of stevia (*Stevia rebaudiana*, Bertoni) as influenced by different soil types of Bangladesh. **Journal of the Bangladesh Agricultural University**, v.13, n.1, p.31-37, 2015.

ANEXOS

Anexo 1. Quadrados médios da análise de variância para variáveis associadas à produção de massa seca¹ de quatro genótipos de estêvia.

F.V	G.L	MS Total (Kg.ha ⁻¹)	MS Caule (Kg.ha ⁻¹)	MS Folhas (Kg.ha ⁻¹)	Nº ramos sec	Nº ramos terc	Comp. Maior ramo
Blocos	3	52915,56 ^{ns}	62284,21 ^{ns}	8241,53 ^{ns}	0,15 ^{ns}	6,12 ^{ns}	7,22 ^{ns}
Tratamentos	3	755320,68 [*]	332472,8 ^{ns}	192444,84 ^{**}	1,79 ^{**}	1917,64 ^{**}	330,33 ^{**}
Resíduo	9	112279,32	89747,28	6691,31	0,07	23,46	17,56
Total	15						
Coef.Var (%)		23,82	38,14	13,17	7,62	8,35	7,73
Bartlett (χ ²)		2,32 ^{ns}	6,99 ^{ns}	9,53 ^{ns}	2,08 ^{ns}	0,53 ^{ns}	1,16 ^{ns}

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$), * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$), ns não significativo ($p \geq .05$). ¹ Massa seca total (MS Total), Massa seca de caule (MS Caule), Massa seca de Folhas (MS Folhas), Número de ramos secundários (Nº ramos sec), Número de ramos terciários (Nº ramos terc), Comprimento do Maior Ramo (Comp. Maior ramo).

Anexo 2. Quadrados médios da análise de variância para variáveis associadas à avaliação quantitativa de crescimento¹ de quatro genótipos de estêvia.

F.V	G.L	AFT	IAF	RAF	AFE	RPF
Blocos	3	13414,81 ^{ns}	858546,98 ^{ns}	49,74 ^{ns}	109,80 ^{ns}	0,011 ^{ns}
Tratamentos	3	707427,51 ^{**}	45275352,69 ^{**}	759,21 ^{**}	2587,68 ^{**}	0,024 ^{ns}
Resíduo	9	32526,28	2081680,56	87,75	239,3	0,0085
Total	15					
Coef.Var (%)		27,02	27,02	25,23	19,13	20,25
Bartlett (χ ²)		11,44 ^{ns}	11,44 ^{ns}	3,41 ^{ns}	6,54 ^{ns}	3,29 ^{ns}

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$). ¹ área foliar total (AFT), índice de área foliar (IAF), razão de área foliar (RAF), área foliar específica (AFE), Razão de peso de folha (RPF).

Anexo 3. Quadrados médios da análise de variância para cinco variáveis associadas ao acúmulo de glicosídeos de esteviol de quatro genótipos de estêvia. Est (Esteviosídeo), Reb (Rebaudiosídeo A).

F.V	G.L	Esteviosídeo mg g ⁻¹	Rebaud A mg g ⁻¹	Razão Rebaud A/Estv	Est (Kg.ha ⁻¹)	Reb A (Kg.ha ⁻¹)
Blocos	3	307,01 ^{ns}	68,94 ^{ns}	0,00084 ^{ns}	280,14 ^{ns}	3,95 ^{ns}
Trat.	3	4070,57 ^{**}	1671,63 ^{**}	0,11 ^{**}	11987,55 ^{**}	320,16 ^{**}
Resíduo	9	96,52	51,17	0,00062	192,29	5,29
Total	15					
Coef.Var (%)		6,03	17,77	9,3	13,05	10,22
Bartlett (χ ²)		4,39 ^{ns}	9,5 ^{ns}	1,82 ^{ns}	11,25 ^{ns}	2,91 ^{ns}

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$).